



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

**Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Istologia, Microbiologia e
Biotecnologie Mediche**

**Studio dei microRNA associati ad infezione da
papillomavirus**

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: BIOMEDICINA

CICLO: XXIV

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Giorgio Palù

Supervisore : Ch.ma Prof.ssa Luisa Barzon

Dottoranda: Dott.ssa Elektra Peta

INDICE

RIASSUNTO.	1
ABSTRACT.	3
INTRODUZIONE.	5
1. Caratteristiche dei HPV e ciclo replicativo.	6
2. Oncogenesi da HPV : E6 ed E7 due oncoproteine fondamentali per la trasformazione della cellula ospite.	10
3. MicroRNA.	14
Biogenesi dei microRNA.	14
4. MicroRNA e carcinoma della cervice uterina.	18
5. Alterazione del espressioni dei microRNA cellulari dalle oncoproteine virali E6 ed E7.	21
Scopo dello studio.	27
MATERIALI E METODI.	29
STUDIO SU LINEE CELLULARI.	29
1. COLTURE CELLULARI PRIMARIE.	29
2. LINEE CELLULARI TUMORALI.	29
3. VETTORI RETROVIRALI.	30
4. INFEZIONE CON I VETTORI RETROVIRALI.	31
4.1 Infezione dei cheratinociti umani.	31
4.2 Infezione dei fibroblasti umani.	31
4.3 PCR per valutare l'espressione di neoR.	32
4.4 PCR per valutare l'espressione dei geni E6 e E7 di HPV16 e HPV6 nelle cellule stabilmente infettate.	32
5. ANALISI DELL' ESPRESSIONE DEI miRNA MEDIANTE MICROARRAY.	33
5.1 Estrazione del RNA totale.	33
5.2 Quantificazione e controllo di qualità dell'RNA estratto.	33
5.3 Analisi del profilo di espressione dei miRNA con miRNA-microarray.	34
5.4 Analisi statistica dei dati ottenuti dai microarray.	34
6. ANALISI DEL PROMOTORE DEL MIR146A.	37
6.1 Predizione di putativi siti di legame dei fattori di trascrizione sul promotore del miR-146a tramite un software specifico.	37

6.2 Mutagenesi.	38
6.3 Plasmidi.	39
6.4 Espansione dei plasmidi.	40
6.5 Sintesi dei primer per la mutagenesi.	41
6.6 Trasfezione transiente dei cheratinociti stabilmente infettati e test della luciferasi.	42
7. STUDIO DELL'ATTIVITA' DEL MIR-146A.	43
7.1 Trasfezione stabile di miR-146a in cheratinociti primari e in linee di cervico-carcinoma.	43
7.2 Test della proliferazione cellulare: Saggio della BrdU.	43
7.3 Test della vitalità cellulare: Saggio MTT.	44
7.4 Saggio di migrazione cellulare.	45
STUDIO SU CAMPIONI DI CELLULE CERVICALI.	46
1 Campioni.	46
2. Purificazione del DNA.	46
3. Determinazione di sequenze virali mediante PCR	47
4. Estrazione di RNA.	47
5. Analisi d'espressione dei microRNA.	47
6. Normalizzazione con un controllo endogeno.	47
7. Analisi statistica.	48
STUDIO SU TESSUTI DEL CARCINOMA SQUAMOCELLULARE DEL PENE.	48
1. Campioni.	48
2. Analisi immunohistochimica (IHC) dell'espressione di p53 e di p16INK4a.	48
3. Estrazione del DNA, ricerca e genotipizzazione di HPV.	49
4. Estrazione di RNA, trascrizione inversa e real-time PCR.	49
5. Analisi statistica.	50
RISULTATI.	53
1. Le proteine E6 ed E7 di HPV16, ma non di HPV6, alterano l'espressione di alcuni microRNA nei cheratinociti umani.	53
2. E6 ed E7 di HPV16 alterano l'espressione dei miRNA anche in altri tipi di cellule: analisi in fibroblasti umani.	60
3. Profilo di espressione dei microRNA nelle linee cellulari di carcinoma della cervice uterina.	63

4. Analisi del profilo di espressione dei microRNA in campioni citologici cervicali.	66
5. Analisi dell'espressione dei microRNA in carcinomi e condilomi del pene.	74
6. Il miR-146a diminuisce la proliferazione e la migrazione dei cheratinociti.	80
7. L'oncoproteina E6 di HPV16 attiva il promotore del miR-146a tramite NF-kB, c-Myc e IRF3/IRF7.	85
DISCUSSIONE.	89
BIBLIOGRAFIA.	97
Ringraziamenti.	109

RIASSUNTO

I microRNA giocano un ruolo fondamentale nella cancerogenesi. Molti virus modificano l'espressione dei microRNA cellulari per sopravvivere all'interno della cellula ospite inibendo l'apoptosi cellulare e stimolando la proliferazione cellulare. Studi recenti hanno dimostrato l'alterazione dell'espressione di alcuni microRNA in linee del carcinoma della cervice uterina positive per papilloma virus umano (HPV) ed in colture organotipiche di cheratinociti umani positivi per HPV.

Lo scopo di questo studio è stato l'identificazione di microRNA cellulari coinvolti nell'oncogenesi dal HPV e la caratterizzazione funzionale della loro attività in cheratinociti umani normali e in linee cellulari di cancro del collo dell'utero.

Abbiamo quindi ricercato tramite miRNA microarray e qRT-PCR i microRNA cellulari, la cui espressione è modificata dalle oncoproteine E6 ed E7 di HPV. È stata dimostrata la significativa soppressione dell'espressione del miR-34a da parte di HPV16 E6, in accordo con i dati della letteratura e con il suo ruolo di effettore di p53. È stato inoltre dimostrato che E7 di HPV16, invece, induce l'espressione di altri miRNA della famiglia miR-34, ovvero il miR-34b ed il miR-34c-5p, oltre ai miR-15b, miR-16 e miR-486-5p, mentre inibisce l'espressione dei miR-22, miR-29b e miR-29c. E6 ed E7 di HPV16 esercitavano inoltre un effetto opposto sull'espressione di alcuni microRNA cellulari, tra cui il miR-146a, inibito da E6 e indotto da E7. Inoltre, l'espressione del miR-146a è risultata praticamente assente nelle linee cellulari di carcinoma del collo dell'utero. Al contrario, i geni E6 ed E7 di HPV6, un HPV a basso rischio oncogeno, non hanno portato a alterazioni significative nell'espressione di alcun microRNA cellulare. L'espressione di questi microRNA è stata analizzata in casistiche di campioni citologici cervicali e di carcinomi e condilomi del pene per verificarne la correlazione con l'infezione da HPV oncogeni. In questi campioni è stato confermato che l'infezione da HPV oncogeni si associa ad una significativa riduzione dell'espressione dei miR-34a/b/c, a miR-218, miR-210 e dei microRNA della famiglia let-7. Tuttavia, considerando l'espressione dei trascritti E6/E7 degli HPV ad alto rischio, e non la sola presenza di DNA di HPV ad alto rischio, si è osservato che la presenza dei trascritti virali si associava alla *down-regulation* del miR-34a, ma non dei miR-34b e miR-34c. Nel 30% dei carcinomi squamosi del pene analizzati in questo studio sono state rilevate sequenze genomiche di HPV, mentre tutti i condilomi erano positivi per gli HPV a basso rischio HPV6 o HPV11. In questi campioni, i livelli di miR-34a erano più elevati nei carcinomi che negli adenomi; il miR-218 era più elevato nei carcinomi HPV-positivi che in quelli negativi; inoltre, i livelli di miR-146a erano più bassi nei campioni p16INKa-positivi (marcatore di infezione da HPV oncogeni) che in quelli

p16INKa-negativi e, in accordo, nei campioni positivi per HPV-oncogeni che in quelli negativi. Nei cheratinociti normali e nelle linee cellulari di cervico-carcinoma, la sovraespressione del miR-146a ha portato ad una significativa riduzione della proliferazione e della migrazione cellulare. Infine, mediante mutagenesi sito-specifica nel promotore del miR-146a, è stato dimostrato che nei cheratinociti la repressione dell'espressione del miR-146a da parte di E6 di HPV16 è mediata principalmente da c-Myc.

In conclusione, questo studio ha portato all'identificazione dei microRNA modulati dalle oncoproteine E6 ed E7 degli HR-HPV e ne ha confermato l'anomala espressione in campioni clinici cervicali e penieni con infezione da HR-HPV. Questo studio ha inoltre caratterizzato l'attività antiproliferativa nei cheratinociti del miR-146a, il quale è down-regolato da E6 di HR-HPV.

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) play an important role in tumorigenesis. Several viruses alter cellular miRNA expression to survive in the host by inducing cell proliferation and inhibiting apoptosis. Some recent studies have shown an alteration of miRNAs expression in HPV-positive cervical carcinoma cell lines and in HPV-positive keratinocyte raft cultures.

Aim of this study was to identify cellular miRNAs involved in human papillomavirus (HPV) oncogenesis and to characterize their functional activity within the normal human keratinocytes and within cervical carcinoma cell lines.

We investigated cellular miRNAs whose expression was altered by HPV E6 and E7 oncoproteins by using miRNA microarrays and qRT-PCR. The expression of miR-34a was significantly downregulated by HPV16 E6, in agreement with its role as p53 effector. In addition, we demonstrated that HPV16 E7 induces the expression of other miRNAs of the miR-34 family, i.e., miR-34b and miR-34c, as well as miR-15b, miR-16, and miR-486-5p, while it inhibits the expression of miR-22, miR-29b, and miR-29c. E6 and E7 also exert opposite effects on the expression of some cellular miRNAs, like miR-146a, which was inhibited by E6 and induced by E7. In cervical carcinoma cell lines, miR-146a expression was very low. At variance, E6 and E7 of HPV6, a low-risk HPV, did not significantly alter host miRNAs expression. To verify a correlation with HPV infection, expression of these miRNAs was analyzed in a group of cervical cytology specimens and in a group of penile carcinoma and condyloma specimens. In these samples, we confirmed that oncogenic HPV infection was associated with a significant reduction of miR-34a/b/c, miR-218, miR-210, and let-7 family miRNA expression. In addition, considering expression of high-risk HPV E6/E7 mRNA, and not only the presence of high risk HPV DNA, we observed that the presence of the viral transcripts was significantly associated with miR-34a down-regulation, but not with miR-34b and miR-34c down-regulation. MiRNA expression was also investigated in a series of penile squamous cell carcinomas (30% positive for high-risk HPVs) and condylomas (all positive for low risk HPVs). In these samples, miR-34a levels were higher in carcinomas than in condylomas; miR-218 was higher in HPV-positive carcinomas than in HPV-negative carcinomas; in addition, miR-146a levels were lower in p16INKa-positive samples (a marker of oncogenic HPV infection) than in p16INKa-negative samples and, accordingly, high-risk HPV-positive samples than in negative samples. In normal keratinocytes and in cervical carcinoma cell lines, miR-146a over-expression significantly inhibited cell proliferation and cell migration. Inactivation of transcription factor binding sites in the miR-146a promoter by site-specific

mutagenesis, we demonstrate that miR-146a repression in HPV16 E6 expressing keratinocytes was mainly mediated by c-Myc.

Through inactivation, this study identified the microRNAs modulated by HR-HPV E6 and E7 oncoproteins and confirmed their abnormal expression in HR-HPV infected cervical and penile clinical samples. This study also characterized the antiproliferative activity of miR-146a on human keratinocytes and the down-regulation of miR-146a by HR-HPV E6.

INTRODUZIONE

Oltre 120 differenti tipi di papillomavirus umano (HPV) sono stati isolati e caratterizzati ad oggi. Circa 40 HPV sono in grado di infettare il tratto anogenitale maschile e femminile e, di questi, 12 sono stati classificati come agenti cancerogeni dall'International Agency for Research on Cancer (IARC) e sono definiti per questo HPV ad alto rischio (HR-HPV) (Bouvard V et al., 2009.). L'infezione persistente da HPV è stata dimostrata essere causa necessaria, anche se non sufficiente, del carcinoma della cervice uterina e il virus è rilevabile virtualmente in tutti i casi di cancro invasivo del collo dell'utero. L'infezione persistente di HR-HPV è stata implicata anche nello sviluppo di circa l'85% dei casi carcinoma anale e di una rilevante percentuale di carcinoma vaginali (65-90%), vulvari (20-75%), del pene (50%), dell'orofaringe (30-70%) e della laringe (10%) (de Sanjose S et al., 2010; Giuliano AR et al., 2008). Inoltre, alcuni carcinomi cutanei non-melanoma sembrano essere attribuibili all'infezione da HPV cutanei (Ekström J et al., 2011).

Il carcinoma della cervice uterina, la cui incidenza mondiale è di circa 450.000 nuovi casi per anno, è la seconda causa di morte per cancro nella donna. In Italia ogni anno vengono registrati circa 3.500 nuovi casi di carcinoma della cervice e 1.100 decessi per questa neoplasia (da "I tumori in Italia" – Rapporto 2006). L'American Cancer Society ha stimato che negli Stati Uniti nel 2009 ci siano stati 11.270 nuovi casi e circa 4.070 decessi per carcinoma cervicale invasivo, nonostante dal 1995 al 1992 la percentuale di decessi sia calata del 74% e si stimi che continui a decrescere del 4% l'anno. La maggior parte dei carcinomi cervicali è di tipo squamocellulare e si sviluppa da lesioni intraepiteliali dell'epitelio squamoso.

Come sopra riportato, evidenze sperimentali ed epidemiologiche dimostrano che l'infezione persistente da HPV è causa necessaria del cervico-carcinoma e delle sue lesioni pre-cancerose, come già proposto da zur Hausen sin dagli anni '70 (zur Hausen *et al.*, 1974). Per la progressione maligna delle lesioni è però necessaria l'acquisizione di una serie di mutazioni genomiche a carico delle cellule epiteliali. I papillomavirus umani costituiscono un gruppo numeroso ed eterogeneo di virus appartenenti alla famiglia *Papillomaviridae*. Esistono più di 120 diversi genotipi di HPV, almeno 40 dei quali infettano la mucosa genitale (Howley&Douglas, 2007). I genotipi genitali sono definiti "ad alto rischio" o "a basso rischio" a seconda della loro oncogenicità (Munoz *et al.*, 2003). Dei genotipi di HPV attualmente definiti ad alto rischio (ovvero, HPV di tipo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59), HPV-16 è associato a circa il 60% dei casi di cervico-carcinoma, HPV-18 al 10%, HPV-45 e HPV-31 al 4%; i genotipi HPV-33, HPV-52 e HPV-58 contribuiscono complessivamente ad un altro 2% dei casi di cervico-carcinoma. I genotipi di HPV a basso rischio HPV-6 e HPV-11 sono responsabili di circa il 90% dei condilomi ano-genitali.

L'infezione da HR-HPV è frequente nelle donne giovani ed è riscontrata in circa 13% delle donne italiane di età compresa tra 25 e 34 anni, mentre è meno frequente nelle donne di età superiore ai 35 anni, nelle quali gli HPV ad alto rischio sono riscontrabili nel 5,8% dei casi (Ronco *et al.*, 2008).

Il carcinoma squamoso del pene è una neoplasia relativamente rara che ha origine tipicamente dall'epitelio del prepuzio e del glande (Pizzocaro G *et al.*, 2010). Il carcinoma del pene rappresenta meno dello 0,5% dei cancri dell'uomo nei paesi occidentali e circa il 10% dei cancri in paesi ad elevate incidence in Sud America e Africa (IARC, 2007). Sequenze genomiche di HPV sono rilevabili nel 30-60% dei carcinomi invasivi del pene e la prevalenza dell'infezione da HPV varia nelle diverse casistiche (Miralles-Guri C *et al.*, 2009; Backes DM *et al.*, 2009; Mannweiler S *et al.*, 2011; Cubilla AL *et al.*, 2010; Palefsky JM *et al.*, 2007; Rubin MA *et al.*, 2001; Tornesello ML *et al.*, 2008). La presenza di HPV nel carcinoma del pene correla con la diagnosi istopatologica di carcinoma basaloide o verrucoso, mentre è meno frequente nel più frequente carcinoma squamoso cheratinizzante (Rubi *et al.*, 2001, Backes *et al.*, 2009; Cubilla *et al.*, 2010). HPV16 e, meno frequentemente, HPV18 sono i tipi virali associati al carcinoma del pene, mentre HPV31 e HPV33 sono stati rilevati raramente (IARC 2007; Rubin *et al.*, 2001, Tornesello *et al.*, 2008, Backes *et al.*, 2009, Cubilla *et al.*, 2010, Mannweiler *et al.*, 2011).

1. Caratteristiche dei HPV e ciclo replicativo

Il papillomavirus è un virus di piccole dimensioni, che originariamente era stato incluso insieme ai polyomavirus nella famiglia dei *Papovaviridae* per le comuni caratteristiche capsidiche e genomiche. Successivamente, studi funzionali e di sequenza hanno dimostrato come papillomavirus e polyomavirus siano in realtà molto diversi tra loro, tanto da poter essere inclusi in famiglie distinte. Attualmente la famiglia dei *Papillomaviridae* è riconosciuta ufficialmente dall'International Council on Taxonomy of Viruses (ICTV) (de Villiers *et al.*, 2004).

I papillomavirus sono molto diffusi in natura e possono infettare un ampio numero di vertebrati, avendo però una specie-specificità molto alta ed uno specifico tropismo per le cellule epiteliali squamose.

HPV è un virus di piccola taglia (52-55 nm di diametro), il virione è privo di envelope; il capside icosaedrico è composto da 72 capsomeri formati da due proteine strutturali L1 ed L2; il genoma è a DNA circolare a doppio filamento (circa 8.000 bp), il sito di replicazione del DNA virale e di assemblaggio capsidico è nucleare. Il genoma dei papillomavirus presenta almeno una decina di *open reading frames* (ORF) localizzati in un solo filamento di DNA. Un solo filamento quindi funge da stampo per la trascrizione delle proteine precoci (E, Early) e tardive (L, Late). Le regioni

precoci del genoma virale sono espresse nelle cellule con infezione non produttiva e nelle cellule trasformate, mentre le regioni tardive, incluse le proteine capsidiche L1 ed L2, sono espresse solo nelle cellule in cui avviene un'infezione produttiva. Questo si riflette su una caratteristica essenziale del virus, cioè sulla sua capacità di dare un'infezione produttiva esclusivamente nelle cellule squamose in differenziamento terminale e quindi sul fatto che il ciclo vitale del virus sia strettamente correlato con il programma di differenziamento dell'epitelio squamoso. I papillomavirus sono caratterizzati da un particolare tropismo per le cellule degli epitelii squamosi e l'infezione ha solitamente inizio nelle cellule basali e parabasali dell'epitelio, dotate di spiccata attività proliferativa. Quindi, per dare infezione, il virus deve poter accedere al compartimento "germinativo" dell'epitelio ed è necessaria la presenza di soluzioni di continuo della cute e delle mucose.

Nella fase iniziale dell'infezione, quando cioè il virus colonizza le cellule basali e parabasali dell'epitelio, il genoma virale va incontro ad una replicazione in forma episomiale, essendo presente come frammento extracromosomico di DNA circolare. Durante l'infezione produttiva, l'espressione dei geni virali procede sequenzialmente seguendo le fasi di differenziamento dell'epitelio, a partire dalle cellule basali e parabasali, dove i geni precoci del virus sono più attivi, fino agli strati superiori dell'epitelio (intermedio e superficiale), in cui si assiste ad una significativa produzione di proteine capsidiche e alla formazione del virione completo, ovvero la particella virale infettante (Howley&Douglas, 2007).

Il genoma di HPV (fig. 1) contiene una regione principale regolatoria, costituita da un lungo segmento di controllo (*long control region*, LCR), e una regione codificante le proteine virali strutturali e non strutturali. La maggior parte degli HPV hanno sei geni non strutturali ampiamente studiati e descritti (*E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* ed *E7*) e due ORFs (*E3* e *E8*) la cui funzione non è ancora ben nota. La maggior parte dei geni virali sono multifunzionali.

La proteina E1 ha un'attività di DNA replicasi necessaria per la replicazione del DNA. E2 regola l'attivazione e la repressione della trascrizione genica e partecipa alla regolazione della replicazione del DNA virale. Tale attività è mediata dal legame della proteina E2 alla regione di controllo del genoma virale (LCR). *E4* codifica per una fosfoproteina citoplasmatica, la cui funzione non è stata ancora identificata. HPV ha tre oncogeni principali: *E5*, *E6* ed *E7*. La proteina codificata da *E5* esplica la propria funzione oncogena interagendo e attivando recettori specifici per fattori di crescita. La proteina E6, in particolare quella dei *tipi* ad alto rischio, induce la degradazione ubiquitina-dipendente del soppressore tumorale p53, mentre la proteina E7 lega ed inattiva la forma non fosforilata di un altro soppressore tumorale, la proteina del retinoblastoma pRb.

Le proteine strutturali di HPV sono essenzialmente due: L1 ed L2. Le proteine L1 costituiscono il capside virale, il quale è composto da 72 pentameri di L1. Gli epitopi immunodominanti neutralizzanti sono localizzati su L1. La proteina L2 è presente in minore quantità rispetto ad L1 e partecipa con quest'ultima alla formazione del capside.

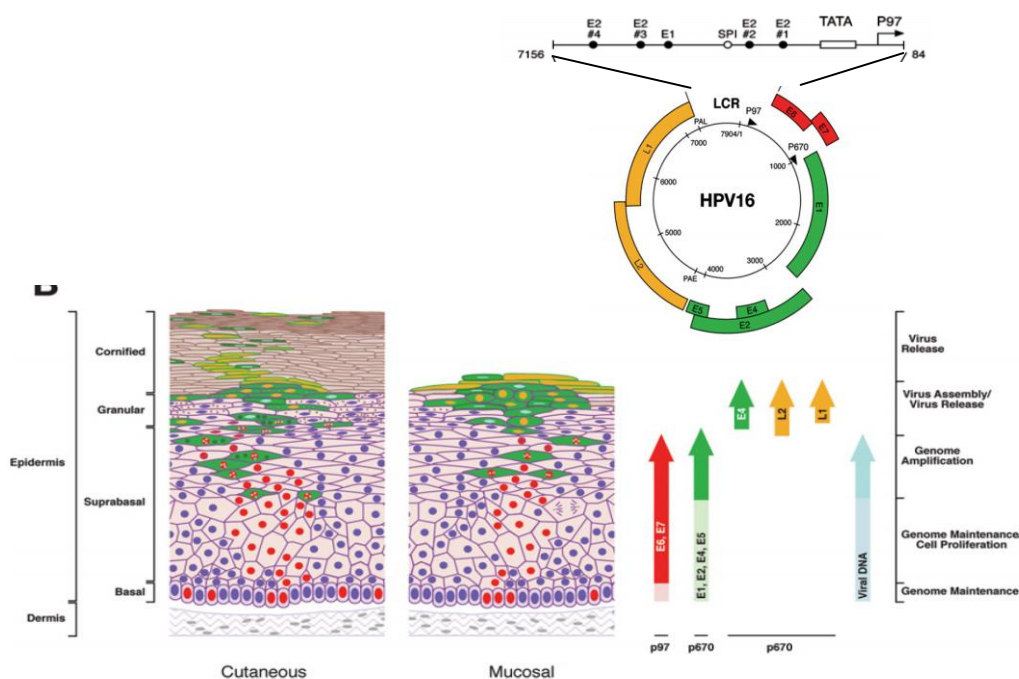


Fig. 1. Rappresentazione schematica del genoma di HPV e del ciclo replicativo virale (da Doorbar *et al.*, 2005).

I geni virali possono essere anche classificati in base all'ordine con cui vengono espressi durante il ciclo replicativo, e suddivisi quindi in geni precoci (*early*) e tardivi (*late*). I geni *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* ed *E7*, che codificano proteine coinvolte nella regolazione della replicazione virale e nella trasformazione cellulare, sono espressi precocemente negli strati basali epiteliali, mentre *L1* ed *L2*, essendo geni codificanti le proteine strutturali, sono espressi quasi esclusivamente negli strati superficiali degli epiteli in attiva replicazione (Fig.1).

Nello stato episomiale del virus, l'espressione degli oncogeni *E6* ed *E7* è inibita dalla proteina E2. L'integrazione del genoma virale nel DNA della cellula provoca un'interruzione della regione codificante la proteina E2 e di conseguenza viene a mancare la sua funzione inibitoria sui promotori degli oncogeni E6 ed E7 (come rappresentato in fig. 2). Il sito di integrazione del DNA virale nei cromosomi della cellula ospite è casuale, ma il tipo di integrazione è clonale: lo stesso in tutte le cellule che compongono una determinata neoplasia.

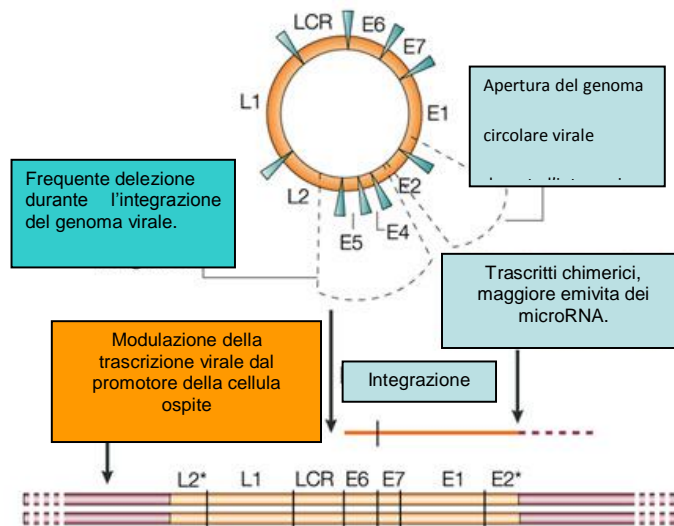


Fig. 2 Rappresentazione schematica della struttura del genoma di HPV integrato nel DNA della cellula ospite (da zur Hausen, 2002).

Nell'epitelio non infettato dal virus, le cellule basali escono dal ciclo cellulare subito dopo essere migrate nello strato parabasale, dove subiscono un processo che porta alla differenziazione. In questo strato si verificano una serie di cambiamenti come il cross-linking dei filamenti intermedi della cheratina, la formazione dello strato corneo e la secrezione di lipidi, che contribuiscono alla formazione di una barriera fisica protettiva contro l'ambiente.

Durante l'infezione da HPV, invece, l'espressione di E6 ed E7 nella cellula blocca i sistemi d'inibizione del ciclo cellulare e, di conseguenza, il normale differenziamento cellulare è inibito (Howley&Douglas, 2007). Le due proteine oncogene, E6 ed E7, collaborano per ottenere tali effetti, e sono espresse dai *tipi* virali ad alto rischio come un mRNA bicistronico (Stacey *et al.*, 2000) sotto il controllo del promotore virale precoce p97. Nei tipi virali non oncogeni invece E6 ed E7 possono essere espressi su differenti messaggeri (Howley &Douglas, 2007). Entrambe le proteine dei tipi virali oncogeni sono capaci di stimolare la progressione del ciclo cellulare associandosi ai regolatori del ciclo cellulare pRb e p53 (Howley&Douglas, 2007).

2. Oncogenesi da HPV : E6 ed E7, due oncoproteine fondamentali per la trasformazione della cellula ospite.

Le oncoproteine E6 ed E7 dei papillomavirus ad alto rischio (HR-HPV) sono fondamentali nel indurre la trasformazione tumorale della cellula ospite durante l'infezione attiva dal virus. Questi due fattori cooperano tra di loro per causare lo sviluppo di un tumore indotto da HPV, agendo in modo complementare l'una con l'altra. Si tratta di due proteine decisamente piccole, di un peso molecolare di 18 kDa e 13 kDa rispettivamente, localizzate nel nucleo cellulare (Laimonis AL & Moddy AC, 2010).

L'espressione della oncoproteina E7 di HR-HPV può indurre l'immortalizzazione dei cheratinociti umani mentre la E6 sempre di HR-HPV non ha questa capacità. L'espressione combinata delle due oncoproteine induce l'immortalizzazione di molte cellule primarie con una efficienza elevata (Hawley-Nelson P et al., 1989). La crescita dei cheratinociti esprimenti E6 e E7 in colture organotipiche (raft cultures), le quali imitano pienamente la crescita del epitelio stratificato e differenziato, comportano dei cambiamenti cellulari identici a quelli osservati nelle lesioni squamocellulari di alto grado *in vivo* (Mc Cance, DJ et al 1988). I topi transgenici esprimenti le due oncoproteine (E6 e E7) nelle cellule basali del loro epitelio hanno sviluppato carcinomi squamocellulari sotto trattamento con una bassa dose di estrogeni. In questi modelli di topi transgenici E7 da sola e in grado di indurre displasia cervicale di alto grado e tumori cervicali invasivi. L'aggiunta del E6 risultava nell'aumento dell'invasività e malignità dei tumori cervicali, confermando la necessità di collaborazione tra le due oncoproteine per promuovere la tumorigenesi (Arbeit, JM et al., 1996). Anche se l'espressione combinata delle proteine oncogene E6 e E7 trasforma in modo efficiente le cellule in coltura, tali cellule (HPV-immortalizzate) dopo essere inoculate nei modelli biologici di topi nudi, non sono in grado di indurre tumori ma necessitano la coespressione di altri fattori tumorali come v-ras o v-fos per acquisire tale abilità (Laimonis AL & Moddy AC, 2010).

Quindi le oncoproteine E7 e E6 di HPV ad alto rischio sono necessarie ma non sufficienti per indurre la trasformazione maligna della cellula ospite. Durante la fase produttiva del ciclo cellulare di HPV, E6 e E7 promuovono la proliferazione delle cellule soprabasali differenziate e non differenziate del epitelio ed inibiscono l'apoptosi cellulare causando un accumulo di danni e mutazioni sul DNA che possono portare nella trasformazione tumorale delle cellule ospiti infettate. Molti sono i pathway cellulari (le vie cellulari) che fanno da bersaglio per le due oncoproteine virali ed risulta interessante studiare come riescono a collaborare tra di loro per capire alcuni dei meccanismi che conducono poi nella trasformazione tumorale della cellula ospite.

Come è stato già accennato sopra, il mantenimento della proliferazione cellulare della cellula ospite è una delle caratteristiche principale durante l'infezione da HPV. L'espressione della oncoproteina E7 nei genotipi ad alto rischio, è il fattore principale che contribuisce non solo nel mantenimento ma anche nel aumento della proliferazione cellulare. Le proteine E7 non possiedono nessun attività enzimatica intrinseca ma svolgono la loro attività legandosi su vari fattori cellulari. Nella figura 3 sono riassunti la maggiore parte dei target cellulari della proteina E7.

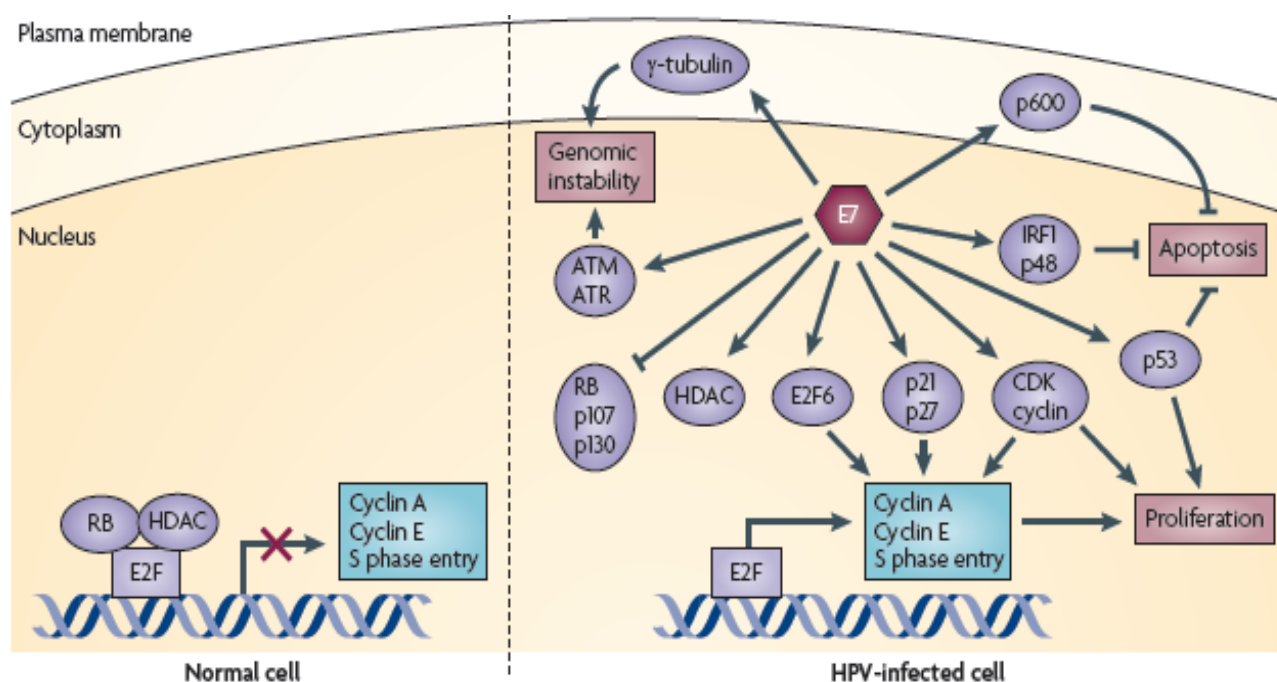


Fig.3 La oncoproteina E7 di HR-HPV ha come target numerosi fattori cellulari. (da Laimonis AL & Moddy AC, 2010)

Il target principale della oncoproteina E7 è il soppressore tumorale Rb e alcuni membri appartenenti nella stessa famiglia del Rb (p107,p130). Il legame di questa oncoproteina sul Rb comporta la degradazione ubiquitina-dipendente via proteosoma del soppressore tumorale e comporta l'attivazione del fattore di trascrizione E₂F il quale regola l'espressione in modo positivo di una serie di geni coinvolti nella progressione del ciclo cellulare, nell'apoptosi, mitosi e differenziamento cellulare. E7 contribuisce nel immortalizzazione cellulare tramite l'interazione con delle molecole chiave (p21 e p27) per il controllo della progressione del ciclo cellulare. Gli inibitori delle chinasi ciclina dipendente (CDK) p21 e p27 regolano l'arresto della crescita cellulare durante il differenziamento epiteliale. La oncoproteina E7 induce l'instabilità della regolazione del ciclo cellulare inibendo direttamente gli inibitori delle CDK e attivando la chinasi ciclina dipendente

2 (CDK2). Interagendo con la γ -tubulina ed aumentando l'attività della CDK2 stimola una sintesi anomala dei centrosomi. E7 interagisce anche con dei fattori della risposta al interferone (IRF1 e p48) aiutando il virus ad evadere dalla sorveglianza immunitaria e contribuisce nella stabilizzazione dell'infezione virale.

Una delle maggiori conseguenze della attività della oncoproteina E7 nel indurre la degradazione o l'inattivazione del Rb e di conseguenza l'attivazione del fattore di trascrizione E₂F è l'aumento di un altro soppressore tumorale detto guardiano del genoma o p53.

L'oncoproteina E6 di HR-HPV entra in gioco a questo punto e lega direttamente il p53 interferendo con la sua capacità nel legare il DNA. Un altro meccanismo utilizzato dalle oncoproteine E6 è quello di richiamare la ubiquitina-ligasi E3 (E6AP) formando un complesso con il p53, cosa che porta alla ubiquitinazione del p53 e come conseguenza alla sua degradazione tramite il proteosoma. Le oncoproteine E6 di HPV a basso rischio (LR-HPV) possono associarsi con le E6AP ma stranamente ciò non comporta la degradazione di p53 (Li X& Coffino P, 1996).

Nella figura 4 sono riassunti alcuni dei target principali della oncoproteina E6 di HR-HPV .

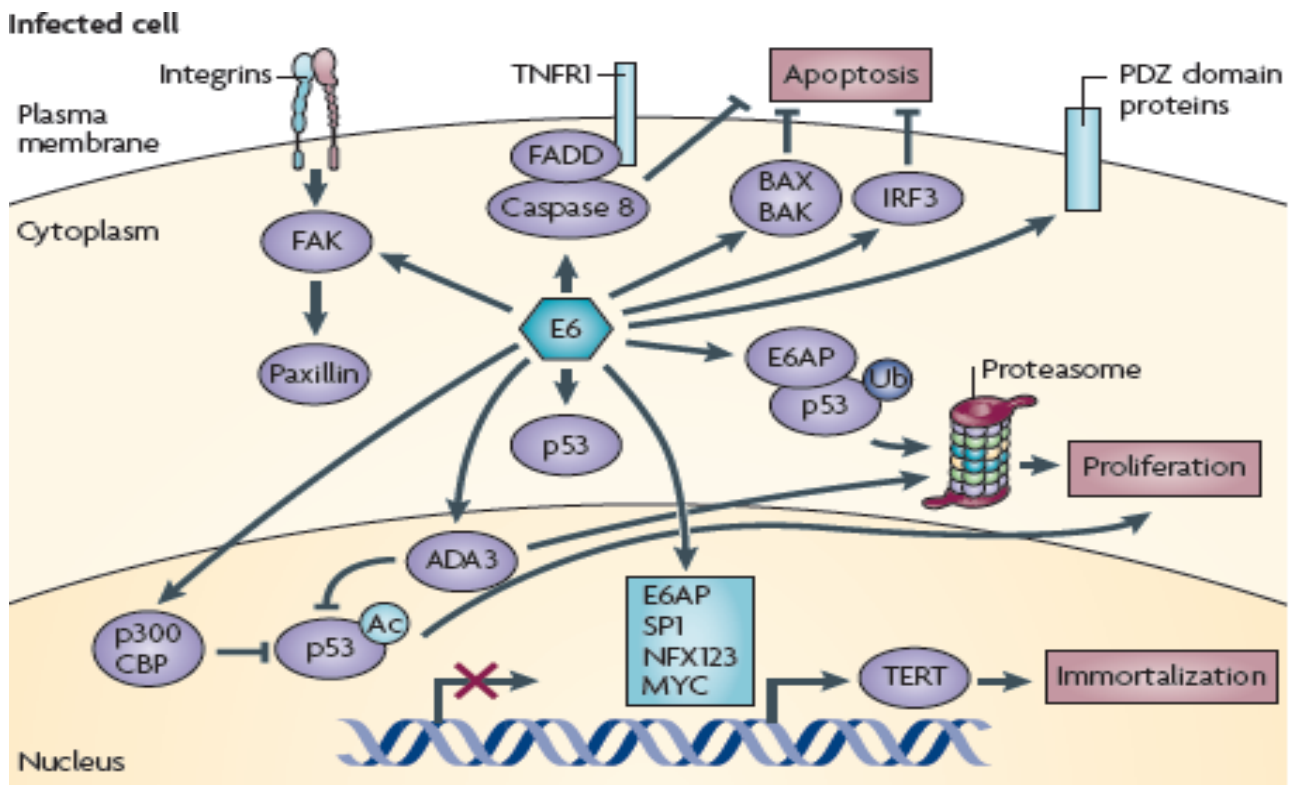


Fig.4 Proteine cellulari e pathway di signaling come target principali della oncoproteina E6 di HPV ad alto rischio da (Laimonis AL & Moddy AC, 2010).

Le oncoproteine di HPV, in particolare la E6 di HPV ad alto rischio aumenta le capacità proliferative delle cellule infette bloccando l'apoptosi della cellula ospite (Laimonis AL & Moddy AC, 2010). E6 interferisce con la funzione del p53 legandosi ai due istoni acetiltrasferasi (p300 e CREB binding protein (CBP)), bloccando la loro capacità di indurre l'acetilazione del p53 interferendo così con la stabilità della proteina (Zimmermann H et al., 1999).

Anche se le conseguenze su p53 dalla attività della oncoproteina E6 sono fondamentali per la trasformazione tumorale della cellula ospite, forme mutate della proteina E6 che non riescono a causare la degradazione del p53, portano lo stesso all'immortalizzazione delle cellule primarie in coltura (Liu Y et al., 1999) suggerendo che si necessita l'interazione anche con degli altri fattori cellulari per lo sviluppo dei tumori. Tra gli target p53-indipendenti della oncoproteina E6 sono le proteine cellulari contenenti i domini di legame PDZ. Mutazioni puntiformi che comportano ad una inattivazione del dominio di legame PDZ nella oncoproteina E6 nel contesto di un genoma virale completo, ha come risultato la diminuzione del tasso della crescita virale, perdita della forma episomiale del DNA virale e aumenta l'integrazione del genoma virale nei cromosomi del ospite, accertando l'importanza di questa interazione per la patogenesi virale (Lee C et al 2007).

L'induzione dell'espressione della telomerasi è un altro modo con cui l'oncoproteina E6 induce l'immortalizzazione cellulare (Wise-Draper TM & Wells SI, 2008).

E6 inibisce una serie di segnali pro-apoptotici all'interno della cellula del ospite (fig.4) interagendo con il recettore del fattore di necrosi tumorale TNF- α (TNFR1), la caspasi 8 e tramite la degradazione delle proteine pro-apoptotiche BAX e BAK (Laimonis AL & Moddy AC, 2010).

Riassumendo, l'aumento della proliferazione cellulare causata dalla oncoproteina E7 dei genotipi di HPV ad alto rischio stimola l'apoptosi cellulare, la quale viene bloccata dalla oncoproteina E6. Una tale collaborazione da parte di queste proteine induce alla immortalizzazione della cellula ospite e va sostenuta dalla terza oncoproteina virale, la E5.

Le oncoproteine E5 sono piccole proteine, di natura idrofobica localizzate principalmente sul reticolo endoplasmatico e contribuiscono nell'attività del E6 ed E7 modulando le proteine di segnale che transitano tramite il reticolo endoplasmatico.

3. MicroRNA

Tra i primi microRNA ad essere scoperti sono *lin-4* e *let-7*, tali microRNA sono stati scoperti durante lo studio dello sviluppo larvale del microorganismo modello *C.elegans* (Lee RC et al., 1993). I microRNA *lin-4* e *let-7*, sono stati identificati al inizio come delle sequenze complementari che riconoscono dei siti conservati all'interno del 3'UTR del mRNA del gene *lin14*. Ulteriori analisi di natura molecolare hanno dimostrato che il legame di questi oligonucleotidi sul 3'UTR del mRNA del gene *lin14*, sono indispensabili per reprimere l'espressione della proteina *lin14* (Wightmann B et al., 1993). Omologhi dei microRNA *let7* e *lin-4/miR-125* sono stati scoperti in altri organismi compresi i mammiferi, dove svolgono un ruolo chiave nel controllare una serie di processi cellulari durante lo sviluppo dei mammiferi (Lagos-Quintana M et al., 2002; Lau NC et al., 2001). Essendo scoperte quindi delle molecole importanti nello sviluppo cellulare e di conseguenza anche nella tumorigenesi cellulare, presto sono diventate un bersaglio di studio da molti scienziati e da allora ci sono circa 3000 pubblicazioni e più di 700 review sui microRNA.

Biogenesi dei microRNA

I microRNA sono una famiglia di piccoli segmenti di RNA monocatenario di circa 22 nucleotidi, non codificanti, espressi sia nelle cellule animali che vegetali. Il genoma umano codifica più di 400 microRNA, e questi possono essere espressi in un numero di alcune migliaia di copie per cellula.

Si pensa che i microRNA giochino un ruolo importante nel differenziamento e nello sviluppo attraverso una regolazione negativa post-trascrizionale dei vari mRNA cellulari.

La trascrizione dei microRNA cellulari avviene ad opera della RNA polimerasi II nella forma di un lungo precursore di RNA, dotato di una coda di poliadenilazione e di un cap, chiamato microRNA

primario (pri-microRNA). Il microRNA maturo fa parte del pri-microRNA, un segmento di 80 nucleotidi con una forcina. La prima tappa nella processazione dei microRNA canonici è il taglio del pri-microRNA per azione dell'enzima Rnase III, detto Drosha mentre per quanto riguarda i microRNA che si trovano al interno degli introni (mirtroni), vengono ancora processati dal spliceosoma (Fig.5). Questo taglio porta alla formazione di un RNA lungo 60 nucleotidi al quale è attaccata una forcina all'estremità 3', chiamato pre-microRNA.

Il pre-microRNA viene così trasportato nel citoplasma con l'aiuto di un'exportina, la karioferina 5: si tratta di un gruppo di proteine coinvolte nel trasporto di molecole attraverso i pori della membrana nucleare. Una volta nel citoplasma, il pre-microRNA viene riconosciuto da un secondo enzima Rnase III detto Dicer, il quale rimuove il loop terminale lasciando l'estremità 3' libera. Ci sono anche delle eccezioni, come per il miR-451 il quale una volta nel citoplasma non viene processato da Dicer ma da Ago2 (Fig.5) Uno dei filamenti del microRNA duplex intermedio viene poi portato via dal complesso silente RNA-indotto. Il microRNA maturo (indicato in rosso nella fig.5) va incorporato nel Ago 1-4, formando miRNPs, altrimenti conosciuto come miRISC. Il miRNP col microRNA maturo può causare la destabilizzazione del mRNA target tramite CCR4 o la repressione della traduzione del trascritto interagendo con i ribosomi nel caso dei microRNA non pienamente complementari col 3'UTR del mRNA target (bersaglio). Quando i microRNA incorporati al complesso miRNP sono pienamente complementari al 3'UTR del mRNA target allora avviene il taglio del target catalizzato da Ago 2 (Farazi TA et al., 2010).

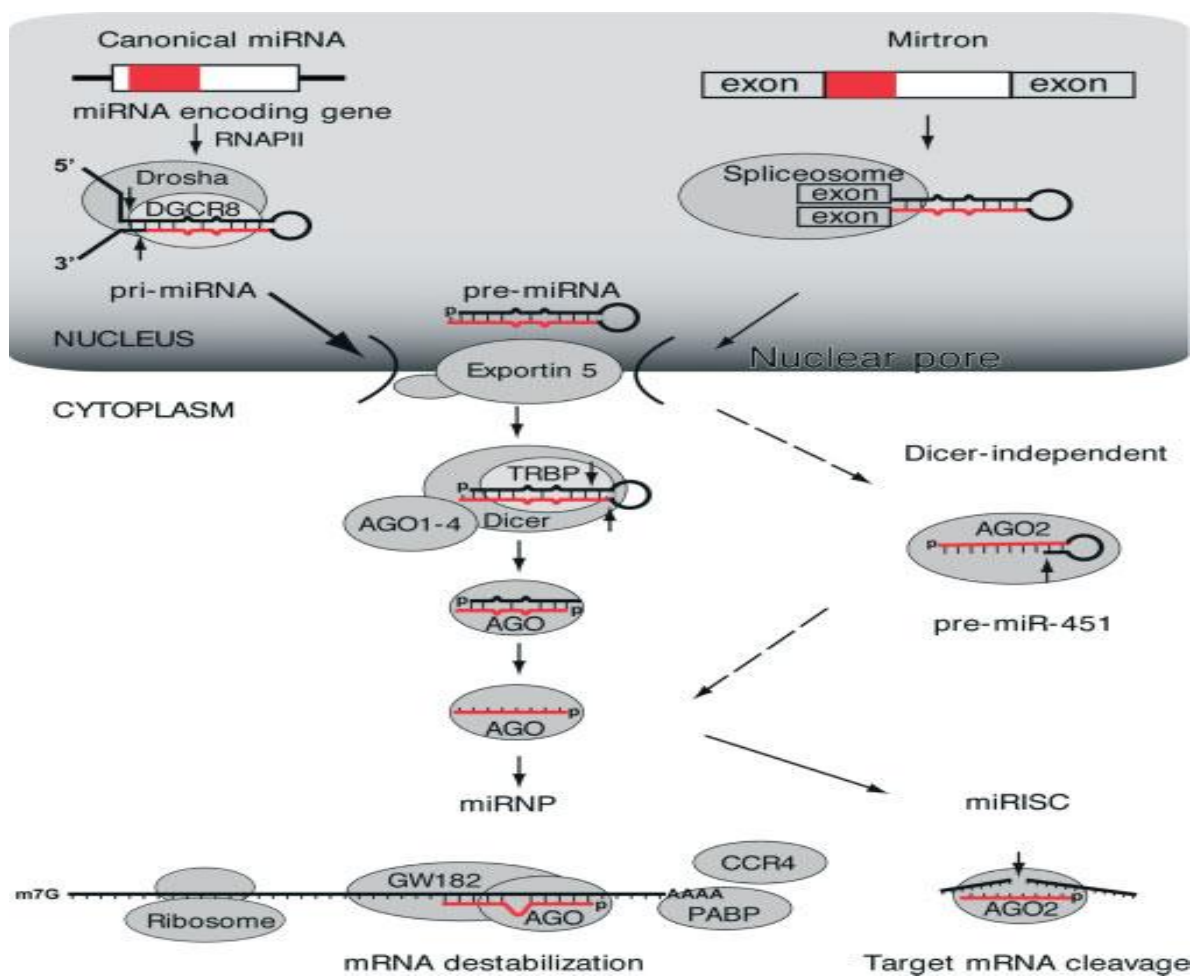


Fig.5 Biogenesi dei microRNA (da Farazi TA. et al., 2010)

Meccanismi che comportano l'alterazione dell'espressione dei microRNA nelle cellule maligne.

I microRNA sono frequentemente espressi come trascritti policistronici. Solo durante l'anno 2010, sono state depositate 1048 sequenze di precursori di microRNA umani nel database del miRBase (Farazi TA et al 2010). Approssimativamente un terzo di questi microRNA (390) sono organizzati in 113 cluster, dove la maggiore distanza tra i microRNA appartenenti nello stesso cluster è di 51 kb. I cambiamenti dei livelli d'espressione dei microRNA tra i campioni normali e quelli tumorali spesso è dovuta nel fatto che molti microRNA sono localizzati sulle regioni cromosomiali instabili (delezioni, amplificazione e traslocazioni) oppure nei punti di rottura cromosomica (Calin GA et al., 2004). Per esempio, il cluster dei miR-15a/16-1 si trova nel cromosoma 13q14, un locus genomico frequentemente deletato nella maggiore parte dei pazienti affetti dalla leucemia cronica dei linfociti B (B-CLL) (Calin GA et al., 2002). Analisi dettagliate di questo locus, su un campione di pazienti affetti dalla leucemia cronica (B-CLL) hanno confermato la delezione di un segmento genomico sul braccio lungo del cromosoma 13 (13q) contenente anche il locus del cluster dei miR-

15a/16-1 nel 70% dei pazienti. L'espressione dei miR-15a/16-1 negli stessi pazienti risulta significativamente diminuita (Calin GA et al., 2002). Tagawa H e Seto MA nel 2005 hanno trovato un'altra regione instabile sul cromosoma 13 (13q31-q32) caratterizzata da amplificazioni genomiche in casi di pazienti col linfoma maligno (Tagawa H & Seto M.A. 2005). Studiando il gene C13orf2, il quale si trova nella locus cromosomico amplificato, hanno trovato una correlazione tra l'espressione di questo gene e del cluster dei miR-17-92. Il gene C13orf2 produce due trascritti mediante splicing alternativo, chiamati trascritto uno e due. Il secondo trascritto contiene anche i microRNA del cluster miR-17-92 (miR-17, miR-18, miR-19a, miR-19b, miR-20 and miR-92), i quali risultano significativamente sovraespressi in 12 linee cellulari di linfomi e su 21 casi di linfoma maligno (Tagawa H & Seto M.A. 2005). Lo stesso cluster di miR-17-92 è stato trovato di essere compreso in una traslocazione cromosomica in uno studio di pazienti affetti dalla leucemia linfoblastica di cellule T (T-ALL) (Mavrakis KJ et al., 2010) ed in fine, il locus cromosomico del mir-26a il quale, risulta amplificato nel glioblastoma (Kim H et al., 2010). Tutti questi sono esempi sulle alterazioni genomiche dei microRNA nei tumori.

Alcuni geni di microRNA sono espressi in modo autonomo, cioè non dipendono dall'espressione di un altro gene o di un intero cluster di microRNA. Il promotore di questi microRNA sotto certe condizioni cellulari aumenta molto l'espressione del proprio microRNA e possono indurre l'espressione anche di geni oncogeni che si possono trovare a valle del micro-RNA nel caso di traslocazioni tumorali (Farazi TA et al., 2010). Il gene del miR-142 è un marker per le cellule ematopoietiche e si trova nel cromosoma 17. La traslocazione t(8;17) causa una leucemia aggressiva delle cellule B dovuta ad una sovra espressione del oncogene MYC (Gauwerky CE et al., 1989).

Il gene del miR-142 dopo la traslocazione si è trovato nella giunzione tra il cromosoma 8 e 17, e solo quattro nucleotidi a valle si è traslocato l'oncogene MYC privo del suo primo esone e di conseguenza anche del promotore che si trovava a monte del primo esone. L'espressione del oncogene MYC in questo caso viene pienamente controllata dal promotore del miR-142.

Molti fattori di trascrizione regolano l'espressione dei microRNA e alcuni microRNA sono regolati da soppressori tumorali o da oncogene per esempio il p53 regola la famiglia dei miR-34a, RAS regola il miR-21 e MYC regola il cluster dei miR-17-92.

I primi esperimenti fatti sul profilo dell'espressione dei microRNA in campioni tumorali riportano un aumento dell'espressione dei microRNA in confronto con i campioni sani (Lu J et al., 2005), tali risultati suggeriscono che la maggiore parte dei microRNA sono soppressori tumorali e pochi funzionano da oncogeni. In uno studio fatto nel 2009 su un campione di tumori vari, da Kumar e i suoi collaboratori (Kumar MS et al., 2009), risulta che il 27% di questi tumori contengono una

delezione in eterozigosi del gene che codifica per l'enzima Dicer. L'inattivazione dell'enzima Dicer, RNASEN e del cofattore DGCR8 in linee tumorali cellulari aumenta il potenziale oncogeno delle cellule tumorali ed accelera la formazione dei tumori (Kumar MS et al., 2007). Le alterazioni che possono avvenire durante la biogenesi dei microRNA a livello post-trascrizionale costituiscono un altro possibile meccanismo che porta nella modificazione dell'espressione dei microRNA nei tumori.

4. MicroRNA e carcinoma della cervice uterina.

Il carcinoma della cervice uterina è una delle maggiori cause di morte per le donne nel mondo, con una incidenza mondiale di circa 450,000 nuovi casi all'anno e con un tasso di mortalità approssimativo di circa 300,000 morti all'anno (www.who.int/hpvcentre). L'infezione dal HPV è ormai ampiamente conosciuta come una delle cause principali di carcinoma cervicale, penile e anale. Tra i 120 genotipi di HPV isolati nel uomo, gli HPV ad alto rischio come HPV16, HPV18 e HPV31 sono stati ritrovati nel 99.9% dei carcinomi squamocellulari cervicali e nel 94%-100% di adenocarcinomi cervicali (Wang X & Zheng ZM, 2011).

L'analisi del profilo di espressione dei microRNA in larga scala, in tutto il genoma umano ha dimostrato che nei vari tumori, l'espressione di molti microRNA risulta significativamente alterata rispetto alle condizioni normali (Farazi TA et al., 2011; Di Leva G & Croce C.M, 2010). Oltre di essere coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare, della proliferazione, del differenziamento cellulare, dell'apoptosi e nella senescenza, i microRNA sono stati correlati con i tumori, ed in particolare con la causa dei tumori, il loro sviluppo e la metastasi tumorale, ma anche con la prognosi tumorale. Come tali, i microRNA sono stati classificati come oncogeni (per esempio., miR-17-92, miR-21, miR155, miR-372/373) oppure soppressori tumorali (per esempio., let-7, miR-15a/16-1, miR-34a, miR-143/145) che a loro volta possono modulare altri soppressori tumorali o degli oncogeni come Ras, Myc, p53 e pRB (Wang X & Zheng ZM, 2011).

Alcuni microRNA come i miR-221/222 e il cluster dei miR-17-92 possono comportarsi da oncogeni in certi tipi cellulari oppure da soppressori tumorali in altri tipi cellulari, tutto dipende dai loro trascritti target e dal tipo di tessuto (Di Leva G & Croce C.M, 2010). Il miR-205 e la famiglia dei miR-200 (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429) ad esempio, sono classificati come soppressori tumorali visto la loro capacità di inibire la metastasi tumorale in modo indiretto (Gregory PA et al., 2008; Korpál M et al., 2008). Questi microRNA collaborano tra di loro per regolare l'espressione di due repressori trascrizionali della E-caderina, ZEB1 (conosciuto anche come deltaEFI) e SIP1 (conosciuto come ZEB2). Si tratta due geni coinvolti nella transizione

epitelio-mesenchimale EMT e nella metastasi tumorale (Gregory PA et al., 2008). L'espressione ectopica di questi microRNA in cellule mesenchimali ha indotto la transizione mesenchimo-epiteliale (MET). In accordo con la loro funzione per quanto riguarda la transizione epitelio-mesenchimale EMT, l'espressione del miR-205 e della famiglia di miR-200, in una linea cellulare derivata da un tumore invasivo del seno, risulta praticamente assente.

Nel lavoro di Wang et al., 2011 viene riportato un numero importante di microRNA (Tabella 1), la quale espressione veniva modificata durante l'infezione da HPV (Wang X & Zheng ZM, 2011).

Li e collaboratori (Li Y. et al., 2011) hanno analizzato l'espressione dei microRNA in sei campioni di tumore cervicale e in sei campioni normali utilizzando la stessa piattaforma di microarray. I suoi risultati sono pienamente compatibili con quelli di Wang et al., 2011 (Tabella 1).

L'espressione di alcuni microRNA come miR-126, miR-143/145, miR-155, e dei miR-424/450 è stata confermata utilizzando una nuova tecnica di sequenziamento, *Deep-Sequencing* (Witten D, et al., 2010). L'aumento dell'espressione del miR-20a, miR-20b, miR-93, e miR-224 e la diminuzione dell'espressione del miR-127, miR-143/145, e del miR-218 nel carcinoma della cervice uterina è stato confermato in tessuti di tumore cervicale confrontati con tessuti normali (2cm lontani dal tessuto tumorale) utilizzando una piattaforma di miRNA microarray diversa da quella utilizzata nel lavoro di Wang et al., 2011 (Rao Q et al., 2011).

Hu e collaboratori hanno analizzato 102 campioni di carcinoma cervicale utilizzando un saggio di PCR per i miRNA ed ha identificato il miR-200a e il miR-9 come candidati promettenti per la predizione della sopravvivenza dal carcinoma cervicale (Hu X et al., 2010).

In altri studi però, nessuno dei due microRNA (miR-9 e miR-200a) risulta significativamente espresso, e un altro lavoro ancora (Rao Q et al., 2011) indica una mancata correlazione del miR-200a con il carcinoma cervicale e la metastasi. Concludendo si può dire che molte analisi indipendenti si necessitano per la valutazione esatta del profilo d'espressione dei microRNA in contesti cellulari particolari come l'infezione da HPV o il carcinoma della cervice uterina. Inoltre, non vi sono studi in letteratura sull'analisi dei microRNA nel carcinoma del pene.

Tabella 1. Riassunto di microRNA significativamente modificati nel tumore cervicale

miRNA	Posizione cromosomica	Wang et al ^a	Li et al ^a	Witten et al ^b
miR-15a	13q14.2	up		
miR-15b	3q25.33	up	up	
miR-16	13q14.2	up	up	
miR-17-5p	13q31.3	up	up	
miR-20a	13q31.3	up	up	
miR-20b	Xq26.2	up	up	
miR-21	17q23.1	up	up	up*
miR-93	7q22.1	up	up	
miR-106a	Xq26.2	up	up	
miR-146a	5q34	up		
miR-148a	7p15.2	up		
miR-155	21q21.3	up	up	up
miR-181c	19p13.13	up		
miR-182	7q32.2	up	up	
miR-183	7q32.2	up		up*
miR-185	22q11.21	up	up	
miR-223	Xq12	up		
miR-224	Xq28	up	up	
miR-324-5p	17p13.1	up		
miR-10b	2q31.1		down	down
miR-29a	7q32.3	down	down	
miR-30b	8q24.22	down		
miR-34a c	1p36.22	down	down	
miR-125a	19q13.41	down		
miR-125b	11q24.1		down	down
miR-126	9q34.3	down	down	down
miR-127	14q32.2	down	down	
miR-133a	18q11.2	down		
miR-133b	6p12.2	down		
miR-143	5q32	down		down
miR-145	5q32	down	down	down
miR-191	3p21.31	down		
miR-218	4p15.31	down	down	
miR-378(422b)	5q32	down		

miR-422a	15q22.31	down		
miR-424	Xq26.3	down	down	down
miR-450	Xq26.3	down	down	down
miR-455	9q32	down	down	
miR-574	4p14	down		

^aRisultati ottenuti tramite l'uso dei microRNA microarray della ditta LC Science (Wang X et al., 2008; Li Y et al., 2011)

^bRisultati ottenuti tramite l'uso della piattaforma di sequenziamento Solexa/Illumina (Witten D et al., 2010)

5. Alterazione dell'espressioni dei microRNA cellulari dalle oncoproteine virali E6 ed E7.

E' ben noto ormai dalla letteratura, che la oncoproteina E6 di HPV, in particolare quella dei HPV ad alto rischio (HR-HPV) ha come target principale, il guardiano del genoma, la proteina p53. Dal'altra parte, la proteina p53 gioca un ruolo importante nel controllare l'espressione di una serie di geni codificanti e non codificanti. Di conseguenza la oncoproteina E6 è in grado di regolare l'espressione di molti microRNA via p53. L'infezione da HPV ad alto rischio induce la riduzione dell'espressione del miR-34a (Wang X et al., 2009). Il miR-34a è un target diretto della p53, la quale induce l'espressione del miR-34a, legandosi sul promotore di questo microRNA (Wang X & Zheng ZM, 2011). Una serie di lavori in letteratura hanno confermato che l'alterazione del livello d'espressione del miR-34a è correlata con la degradazione del p53 causata dalla oncoproteina E6 di HR-HPV durante l'infezione da HPV sia nei tessuti di carcinoma cervicale, sia in raft di cheratinociti in coltura e sia nelle neoplasie intraepiteliali cervicali. Mentre la riduzione del soppressore tumorale pRB dovuto all'espressione della oncoproteina E7 non induce nessun cambiamento nell'espressione del miR-34a. Un legame diretto tra p53 e il miR-34a è stato confermato studiando la linea cellulare di carcinoma cervicale C33a. Questa linea ha il p53 mutato ed è negativa per l'infezione da HPV e non esprime del tutto il miR-34a. L'espressione ectopica della proteina p53 in queste cellule induce l'espressione del miR-34a (Wang X et al., 2009).

Il miR-34a ha come target una serie di molecole coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare, come la ciclina E2, ciclina D1, CDK4, CDK6, E2F1, E2F3, E2F5, Bcl-2, SIRT1, e p18Ink4c. Quindi la oncoproteina E6 inducendo la degradazione ubiquitina-dipendente via proteosoma del p53 e di conseguenza l'inibizione dell'espressione del miR-34a controlla una serie di processi cellulari che riguardano il ciclo cellulare, l'apoptosi, la senescenza cellulare per poi indurre la proliferazione e la trasformazione cellulare (Wang X & Zheng ZM, 2011).

In un studio recente sulla senescenza cellulare indotta dall'attivazione del oncogene B-RAF nei fibroblasti umani (Christoffersen NR et al., 2010), sono stati riportati due microRNA significativamente espressi nelle cellule in senescenza, miR-146a e miR-34a. L'aumento dell'espressione del miR-34a è indipendente dall'espressione del p53 durante l'induzione della

senescenza cellulare da parte del oncogene B-RAF. In un altro studio, delle cellule tumorali inattivano il miR-34a mediante metilazione nei siti CpG in assenza dell'infezione da HPV (Lodygin D et al., 2008) confermando l'esistenza di una regolazione del miR-34a indipendente dal p53.

La oncoproteina virale E6 regola l'espressione del miR-218 e del miR-23b. La diminuzione dell'espressione del miR-218 durante l'infezione da HR-HPV comporta l'aumento dell'espressione della laminina (LMB3), un target del miR-218 (Martinez I et al., 2008). Il meccanismo con quale la oncoproteina porta alla modificazione del miR-218 non si conosce, ma non lo fa tramite il p53 perché il miR-218 risulta altamente espresso nella linea cervicale HPV-negativa e p53 mutata, C33A. Mentre la diminuzione dell'espressione del miR-23b viene indotta dalla oncoproteina virale tramite p53. Il miR-23b come il miR-34a contiene un sito di legame per il p53 sul suo promotore, di conseguenza in assenza di p53 questo microRNA non viene espresso. Au Yeung, C.L. e collaboratori hanno dimostrato che l'attivatore plasminogeno della urokinasi (uPA) è un target del miR-23b e che l'espressione della oncoproteina E6 di HPV 16 induce la diminuzione dell'espressione del miR-23b di conseguenza aumenta la quantità di uPA che a sua volta aumenta la migrazione cellulare delle linee cellulari cervicali CaSki e Siha (Au Yeung CL et al., 2011). Questi dati provano il fatto che la proteina oncogenica E6 di HPV16 induce la modificazione dell'espressione dei microRNA nella cellula ospite tramite p53.

La oncoproteina E7 dei HPV ad alto rischio, regola l'espressione dei miR-15a/miR-16-1 e del miR-203. Il cluster miR-15a/miR-16-1 si trova all'interno del introne del gene DLEU2, il quale è localizzato sul cromosoma 13 (13q14.3) ed è un gene non codificante. La sua trascrizione porta alla trascrizione del cluster miR-15a/miR-16-1 ed è spesso deleta nei pazienti affetti dalla leucemia linfocitaria cronica (Calin GA et al., 2002). Per investigare l'esistenza di una correlazione tra l'infezione da HPV ad alto rischio e l'espressione di questo cluster, Wang e collaboratori utilizzando il metodo di northern blotting, sono andati a studiare il livello di espressione in colture raft di cheratinociti umani (colture organotipiche) con e senza l'infezione da HPV18 (Wang X & Zheng ZM, 2011). L'analisi dell'espressione del cluster miR-15a/miR-16-1 nelle colture raft dei cheratinociti infette con i retrovirus esprimenti l'oncoproteina E6 di HPV18, l'oncoproteina E7 di HPV18 ed entrambi le proteine E6E7 di HPV 18 ha dimostrato che l'espressione del cluster dipende solo dalla oncoproteina E7. Poi hanno fatto l'inverso sulle linee tumorali di carcinoma cervicale, andando ad inibire l'espressione della oncoproteina E7, usando un siRNA (RNA inibitore) specifico per mRNA della E7 sulle CaSki (HPV16 positive) e sulle Siha (HPV18 positive). Le cellule trattate con il siRNA avevano livelli molto più bassi di miR-15a/miR-16-1 in confronto con le cellule non trattate col siRNA, confermando il dato che l'espressione del cluster di miR-15a/miR-16-1 viene controllato dalla oncoproteina E7 nell'infezione da HPV18 e HPV16.

Le oncoproteine E7 del HR-HPV inducono la sottoespressione del miR-203 nei cheratinociti umani (Melar-New M, Laimins LA, 2010), ed a sua volta il miR-203 controlla il passaggio nel epitelio differenziato dei cheratinociti da un stato proliferativo ad un stato non proliferativo (Yi R et al., 2008; Lena AM et al., 2008). Il target del miR-203 è una proteina della famiglia del p53, la deltaNp63 che controlla la proliferazione cellulare nell'epidermide. Il miR-203 risulta una molecola chiave nel controllare il tasso proliferativo delle cellule precursori epiteliali durante il differenziamento dei cheratinociti e durante lo sviluppo epiteliale, tramite la regolazione della DeltaNp63.

Il miR-21 viene spesso trovato sovraespresso nel tumore cervicale, da una serie di lavori in letteratura (Wang X et al., 2009; Li Y et al., 1999) e la modificazione della sua espressione è dovuta ad entrambi le oncoproteine virali E6 ed E7. Questo microRNA è classificato come oncogeno, visto l'aumento della sua espressione in vari tumori come nel tumore della prostata ed risulta particolarmente indotto durante l'aumento del interferone IFN.

Un lavoro interessante di Yang CH e collaboratori (Yang CH et al., 2010) spiega l'aumento dell'espressione del miR-21 in cellule umane e cellule di topo durante l'aumento del interferone, tramite i fattori di trascrizione STAT3 e NF-kB (p63). Sia STAT3 che NF-kB (p63) si legano nel promotore del miR-21 inducendo la sua espressione (Yang CH et al., 2010). Alcuni soppressori tumorali che regolano la morte cellulare, come PTEN e Akt sono stati identificati come target del miR-21. Il miR-21 inibisce l'apoptosi INF-mediata nelle cellule del tumore della prostata, confermando il suo ruolo oncogeno.

Inibendo l'espressione del soppressore tumorale, PTEN la induzione da STAT3 del miR-21 porta al aumento del NF-kB, mantenendo così la cellula in uno stato di infiammazione continua che poi porta nella trasformazione tumorale definitiva (Iliopoulos D et al., 2010). In accordo con tali dati, il fattore di trascrizione STAT3 risulta altamente espresso nei tessuti di carcinoma della cervice uterina e nelle linee cellulari del carcinoma della cervice uterina positive per HR-HPV (Shukla S et al., 2010) e l'espressione delle proteine oncogene E6/E7 di HR-HPV nei cheratinociti umani aumenta l'espressione di NF-kB (Nees M et al 2001). Riassumendo, miR-21 inattiva l'espressione del soppressore tumorale PTEN, e di conseguenza aumenta l'attività del NF-kB ed inibisce una serie di regolatori negativi della via del Ras/Mek/ERK per inibire l'apoptosi (Hatley ME et al., 2010) affiancando così la funzione delle oncoproteine virali E6 ed E7.

Considerando che i microRNA modificano l'espressione di centinaia di proteine, legandosi sui loro trascritti anche i trascritti di HPV possono essere target dei microRNA cellulari alterati, formando una specie di cerchio con un ritorno negativo (loop a feedback negativo).

Lo schema sottostante riassume molto bene questo concetto.

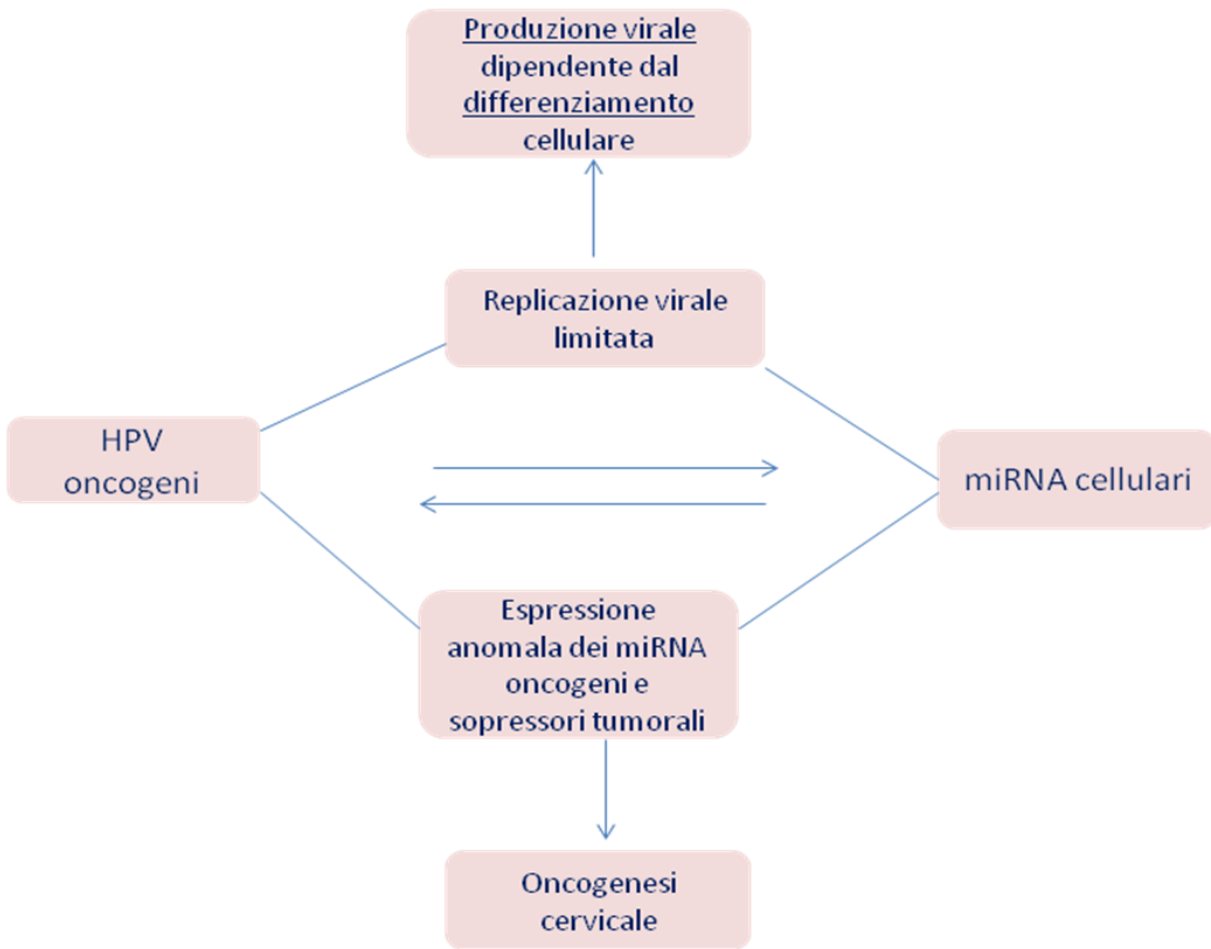


Fig.6 Rappresentazione schematica dell'interazione tra miRNA cellulari e HPV oncogeni.

Per chiudere questo capitolo di introduzione bisogna tornare al inizio, e ricordare che il papilloma virus umano infetta le cellule basali e para basali del epitelio e sfrutta la loro attività proliferativa per poter replicarsi. Dal altra parte per salvaguardare la sua replicazione il virus modifica una seria di molecole della cellula ospite inclusi anche i microRNA, per mantenere un stato di replicazione attiva continua. Il differenziamento delle cellule basali porta nel rilascio delle particelle virali. Guardando lo schema della figura 6, possiamo ipotizzare dell'esistenza di un equilibrio tra HPV e microRNA cellulari, dove la trasformazione tumorale della cellula ospite non sia il vero obiettivo del virus.

Scopo dello studio

I microRNA cellulari regolano una serie di processi cellulari come la proliferazione, la migrazione, il differenziamento e il ciclo cellulare. Queste molecole sono ampiamente coinvolte nelle vie della tumorigenesi cellulare e spesso si comportano da oncogeni o da soppressori tumorali. Molti fattori esterni, come le infezioni virali, possono indurre alterazione dell'espressione dei microRNA cellulari. La relazione funzionale tra i virus e i microRNA cellulari costituisce un argomento di notevole interesse nello studio dell'infezione virale e di altri processi come la risposta immunitaria innata antivirale e l'oncogenesi virale.

Lo scopo di questo studio è stato l'identificazione di microRNA cellulari coinvolti nell'oncogenesi dal papillomavirus umano (HPV) e la caratterizzazione funzionale della loro attività in cheratinociti umani normali e in linee cellulari di cancro del collo dell'utero.

A tal fine sono state utilizzate come modello sperimentale colture primarie di cheratinociti umani trasdotte con vettori retrovirali per far esprimere gli oncogeni virali E6 ed E7 di HPV16 e, come controllo, di HPV6, un HPV a basso rischio oncogeno. Sono state inoltre impiegate linee cellulari di cervico-carcinoma positive e negative per HPV oncogeni. Lo screening per la ricerca di microRNA la cui espressione era alterata dalle oncoproteine virali è stato effettuato mediante analisi dei miRNA microarray. I miRNA così identificati sono stati studiati in campioni clinici di lesioni benigne e maligne cervicali e peniene associate ad infezione da HPV. Il miR-146a, down-regolato da E6 e up-regolato da E7 di HPV16 nei cheratinociti, è stato dimostrato inibire la proliferazione e la migrazione dei cheratinociti normali e di essere represso da c-Myc nei cheratinociti con infezione da HPV oncogeni.

MATERIALI E METODI

STUDIO SU LINEE CELLULARI

1. COLTURE CELLULARI PRIMARIE

HFK (Human Foreskin Keratinocytes) : La linea cellulare HFK (Human Foreskin Keratinocytes) è una linea primaria di cheratinociti umani acquistata dalla ditta ATCC[®], numero di catalogo ATCC PCS-200-010. Si tratta di cellule epiteliali, che aderiscono sulle plastiche comuni, ottenute dal prepuzio di un neonato ed espansi in coltura utilizzando del mezzo di crescita contenente degli inibitori della crescita dei fibroblasti ed una bassa concentrazione di calcio per impedire il differenziamento dei cheratinociti. La crescita in coltura è stata mantenuta usando del terreno di coltura KGM (Keratinocyte Growth Medium 2; PromoCell C-20111), contenente CaCl₂ 0.06 mM ed il fattore di crescita dell'epidermide (EGF, Epidermal Growth Factor) 0.125ng/ml addizionato con siero fetale bovino (10%, FBS). Le cellule sono state incubate a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂. Generalmente le cellule erano subcoltivate 1:3, cambiando il terreno 3 volte alla settimana.

HFF (Human Foreskin Fibroblast): La linea cellulare HFF (Human Foreskin Fibroblast) è una linea di fibroblasti umani originati dal prepuzio di neonato (HFF-1, ATCC®: SCRC-1041™). Sono cellule epiteliali mantenute in coltura utilizzando il terreno di crescita DMEM contenente 4 mM di L-glutamina e BSS Early 1.5g/L bicarbonato di sodio, 0,1 mM amminoacidi non-essenziali, 1,0 mM piruvato di sodio (90%), addizionato con FBS (10%). Le cellule sono state incubate a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂. Generalmente le cellule erano subcoltivate 1:3, cambiando il terreno 3 volte alla settimana.

2. LINEE CELLULARI TUMORALI

CaSki. La linea cellulare CaSki umana (ATCC-CRL-1550) è una linea derivata da metastasi tumorale di carcinoma squamoso cervicale, localizzata nel piccolo intestino, proveniente da una donna di razza caucasica di 40 anni. Si tratta di cellule epiteliali che aderiscono alle comuni plastiche dei contenitori di coltura. Tali cellule presentano il genoma di HPV-16 integrato (HPV-16, circa 600 copie per cellula) e sequenze di HPV-18. La crescita in coltura è stata ottenuta utilizzando il terreno RPMI-1640 contenente 10 mM di HEPES, 1 mM piruvato di sodio, 2 mM L-glutamina, 4.500 mg di glucosio /L, 1.500 mg di bicarbonato di sodio/L (96%), addizionato con siero fetale bovino (FBS, 10%), antibiotici (penicillina e streptomina, 1%). Le cellule sono state incubate a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂. Generalmente le cellule erano subcoltivate 1:10, cambiando il terreno 3 volte alla settimana.

SiHa. La linea cellulare SiHa (ATCC- HTB-35) è una linea cellulare umana ipertriploide con il numero di cromosomi variabile tra 69 e 72, pRB- e p53-positiva. Si tratta di cellule di carcinoma cervicale squamoso provenienti da una donna asiatica di 55 anni. La crescita in coltura è stata ottenuta utilizzando il terreno di crescita DMEM contenente 4mM di L-glutamina e BSS Early 1.5g/L bicarbonato di sodio, 0,1 mM amminoacidi non-essenziali, 1,0 mM piruvato di sodio (90%), addizionato con FBS (10%). Le cellule sono state incubate a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂. Generalmente le cellule erano subcoltivate 1:10, cambiando il terreno 3 volte alla settimana.

C33A. La linea cellulare C33A (ATCC-HTB-31™) è una linea derivata da una biopsia cervicale tumorale. Le C33A sono cellule che presentano un cariotipo ipoploide ed una morfologia epiteliale. Sono caratterizzate dalla presenza della proteina del retinoblastoma (pRB) con delle dimensioni anomale. La proteina p53 è altamente espressa e contiene una mutazione puntiforme nel codone 273 che porta alla sostituzione della Arg -> Cys. Queste cellule sono negative per la presenza di sequenze di DNA o RNA del HPV. La crescita in coltura è stata ottenuta utilizzando il terreno di crescita DMEM contenente 4mM di L-glutamina e BSS Early 1.5g/L bicarbonato di sodio, 0,1 mM amminoacidi non-essenziali, 1,0 mM piruvato di sodio (90%), addizionato con FBS (10%). Le cellule sono state incubate a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂. Generalmente le cellule erano subcoltivate 1:10, cambiando il terreno 3 volte alla settimana.

3. VETTORI RETROVIRALI

PA317 LXS_N 6E6: La linea cellulare PA317 6E6 (ATCC-CRL-2206) è una linea di packaging che prende origine dalla trasfezione della linea cellulare Psi-2 con il vettore retrovirale pLXS_N6bE6.

I virioni prodotti da queste cellule sono stati usati a loro volta per infettare le cellule PA317. Le cellule infettate sono state selezionate in un terreno contenente il G418 (Geneticin® Selective Antibiotic, G418 Sulphate; Gibco®; numero di catalogo 11811-023). Il vettore pLXS_N6bE6 contiene il gene E6 di HPV-6 sotto il controllo del promotore del Moloney murine leukemia virus (MoMuLV) ed un gene di resistenza alla neomicina trascritto dal promotore SV40. Le cellule PA317 6E6 producono un retrovirus anfotropico capace di infettare in modo stabile una ampia gamma di cellule umane. I vettori retrovirali sono stati sviluppati da Denise Galloway, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA.

PA317 LXS_N 6E7: La linea cellulare PA317 LXS_N 6E7 (ATCC-CRL-2207) è una linea di packaging che produce un retrovirus anfotropico contenente il gene E7 di HPV-6.

PA317 LXS_N 16E7: La linea cellulare PA317 LXS_N 16E7 (ATCC-CRL-2205) è una linea di

packaging che produce un retrovirus anfortropico contenente il gene E7 di HPV-16.

PA317 LXS_N 16E6: La linea cellulare PA317 LXS_N 16E6 (ATCC-CRL-2204) è una linea di packaging che produce un retrovirus anfortropico contenente il gene E6 di HPV-16.

PA317 LXS_N 16E6E7: La linea cellulare PA317 LXS_N 16E6E7 (ATCC-CRL-2207) è una linea di packaging che produce un retrovirus anfortropico contenente entrambi gli oncogeni di HPV-16 E7 ed E6.

PA317 LXS_N: La linea cellulare PA317 LXS_N (ATCC-CRL-2202) è una linea di packaging che produce un retrovirus anfortropico contenente solo il gene che da resistenza alla neomicina. Questo retrovirus si usa come controllo di infezione.

4. INFEZIONE CON I VETTORI RETROVIRALI

4.1 Infezione dei cheratinociti umani

L'infezione è stata fatta usando cheratinociti in coltura con una confluenza del 70%. Il giorno prima dell'infezione le cellule di packaging PA317 devono essere in confluenza per l'80% ed il terreno di crescita è sostituito col KGM addizionato del 2% di siero fetale bovino. Il giorno seguente il sovrantante contenente i virioni viene raccolto, poi si aggiunge il polibrene ad una concentrazione finale di 4 µg/ml, in seguito viene filtrato con dei filtri da 0.22 mm ottenendo così il mezzo infettante. I cheratinociti seminati in una fiasca da 25 cm² vanno lavati due volte con PBS (tampone fosfato salino) per eliminare le tracce di siero e successivamente incubati con il mezzo infettante a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂ per 5-6 ore circa. Dopo di che il mezzo infettante è sostituito con del terreno normale di crescita (KGM 10% FBS, 1% P/S) e le cellule sono incubate per 48 ore a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂. Successivamente, le cellule sono poste in selezione con terreno contenente G418 (Geneticin® Selective Antibiotic, Gibco®) ad una concentrazione finale di 200 µg/ml per una settimana circa. Contemporaneamente dei cheratinociti seminati in una fiasca da 25 cm² con la stessa confluenza dei cheratinociti infettati sono messi in selezione come controllo di attività del G418. I cheratinociti non infettati mantenuti in coltura col del KGM addizionato con 200 µg/ml di G418, vanno in senescenza dopo circa cinque giorni di trattamento con l'antibiotico.

4.2 Infezione dei fibroblasti umani

L'infezione dei fibroblasti umani è stata fatta secondo il protocollo descritto nel paragrafo *1. Infezione dei cheratinociti umani* usando del terreno apposito per la crescita in coltura dei fibroblasti (DMEM) e gli stessi retrovirus prodotti dalle linee di packaging. Dopo le 48 ore nel mezzo infettante, i fibroblasti sono stati mantenuti in coltura con DMEM al 10% di FBS e 800 µg/ml di G418 (Geneticin® Selective Antibiotic, (G418 Sulphate) Gibco®) per circa 8 giorni cambiando il terreno ogni due giorni. Le cellule sono state incubate a 37°C in atmosfera al 5% di

CO2.

4.3 PCR per valutare l'espressione di neoR

Dopo circa una settimana di selezione con G418, l'avvenuta infezione e selezione delle cellule infettate è stata valutata tramite PCR con una coppia di primer che amplifica il gene per la resistenza alla neomicina (*neoR*), presente nel vettore: NeoR (Sigma-Aldrich) Fw 5'-ACT GAA GCG GGA AGG GAC TGG-3' Rv 5'-AGA AGC CGA TAG AAG GCG ATG-3'. L'amplificato è lungo circa 520 pb.

4.4 PCR per valutare l'espressione dei geni E6 e E7 di HPV16 e HPV6 nelle cellule stabilmente infettate.

Per valutare l'infezione ed in seguito l'espressione delle oncoproteine virali espresse dai vettori retrovirali LXSN16E6; LXSN6E6; LXSN16E7; LXSN6E7 nelle colture primarie dei cheratinociti e fibroblasti umani è stata fatta una retro-trascrizione con random primer e di seguito sul cDNA è stata fatta PCR usando delle copie di primer che riconoscono in modo specifico i geni E7 ed E6 del HPV16 e HPV6. Le sequenze dei primer sono riportati nella Tabella 2.

La temperatura di annealing per la coppia di primer HPV16E7 ed HPV6E7 è di 56 °C e per la coppia di primer di HPV16E6 e HPV6E6 è di 54 °C. Per disegnare i primer siamo avvalsi del software primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Tabella 2. Sequenza dei primer impiegati nelle reazioni delle PCR specifiche per gli oncogeni E6/E7 di HPV.

Nome	Sequenza	Target	Genotipo
HPV16E6 F	5'-AAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGG-3'	E6	HPV16
HPV16E6 R	5'-ACATCGACCGGTCCACCGACC-3'	E6	HPV16
HPV16E7 F	5'-CCAGCTGGACAAGCAGAACCGGA-3'	E7	HPV16
HPV16E7 R	5'-TGGTTTCTGAGAACAGATGGGGCAC-3'	E7	HPV16
HPV6E6 F	5'-GCAAGAATGCACTGACCACTGCAG-3'	E6	HPV6
HPV6E6 R	5'-GGCAGCGACCCCTCCACGTAC-3'	E6	HPV6
HPV6E7 F	5'-AGATGAGGTGGACGAAGTGGACGG-3'	E7	HPV6
HPV6E7 R	5'-GTCTTCGGTGCGCAGATGGGAC-3'	E7	HPV6

5. ANALISI DELL' ESPRESSIONE DEI miRNA MEDIANTE MICROARRAY

5.1 Estrazione del RNA totale.

Dopo aver verificato mediante PCR l'espressione del gene *neoR* e l'espressione delle proteine oncogene nelle cellule infettate è stato estratto l'RNA totale con mirVana™ miRNA Isolation Kit. Una parte del RNA totale è stato utilizzato per analizzare l'espressione dei miRNA mediante il kit TaqMan® MicroRNA Assay (Applied Biosystems), che consente una accurata determinazione dei miRNA maturi. Il protocollo del kit prevede una fase di retro-trascrizione che utilizza specifici miRNA-RT primer, ed una quantificazione tramite real-time PCR. La seconda parte dell'RNA totale è stato usato per fare l'analisi con microarrays.

5.2 Quantificazione e controllo di qualità dell'RNA estratto.

L'RNA estratto, eluito in acqua DEPC, è stato quantificato tramite analisi spettrofotometrica con NanoDrop-1000 (*Thermo Scientific, MA, USA*). Successivamente è stato sottoposto alla verifica di qualità mediante elettroforesi capillare su gel denaturante utilizzando microchip Agilent su apparecchiatura Agilent 2100 Bioanalyzer (*Agilent Technologies, CA, USA*). I risultati dell'elettroforesi capillare sono visualizzati in un elettroferogramma che permette la visualizzazione dei due picchi di rRNA 18S e 28S, che insieme costituiscono circa l'80% dell'RNA totale, oltre che di un picco relativo al complesso degli RNA a basso peso molecolare, tra i quali sono compresi i miRNA (Fig.7).

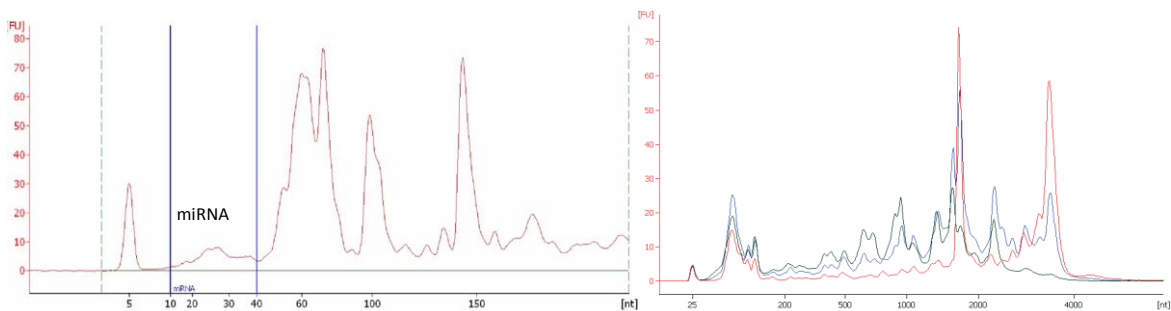


Fig.7 Esempio di un profilo elettroforetico standard ottimale allo spettrofotometro con le diverse popolazioni di RNA rappresentate.

5.3 Analisi del profilo di espressione dei miRNA con miRNA-microarray.

L'analisi con microarrays è stata condotta utilizzando i microarray Human miRNA Microarray Rel12.0 (Agilent Technologies, USA), che contengono sonde corrispondenti a 866 micro RNA umani e 89 micro RNA virali. L'RNA totale dei campioni analizzati (100 ng) è stato marcato con fluoroforo Cy3 utilizzando il miRNA Complete Labeling and Hyb Kit (Agilent, USA) e ibridato sui microarray per 20 ore a 55°C. La scansione dei microarrays è stata effettuata con Scanner Agilent G2565 (Agilent, USA) e l'analisi delle immagini risultanti per ricavarne i dati di fluorescenza è stata effettuata con il software Feature Extraction (Agilent, USA). L'analisi statistica primaria sui dati ottenuti è stata effettuata col software Gene Spring GX (Agilent, USA) nel nostro laboratorio.

5.4 Analisi statistica dei dati ottenuti dai microarray.

Per l'analisi statistica dei dati ottenuti con i microarray ci siamo avvalsi della collaborazione del gruppo di bioingegneri della Dott.ssa Di Camillo. I metodi utilizzati per tale analisi possono essere suddivisi in 2 sezioni principali:

- 1) Il processamento dei dati grezzi, che consiste principalmente nella valutazione della qualità dei dati, nella sottrazione del background, nella normalizzazione e nella ricerca dei valori estremi, detti *outlier*.
- 2) L'analisi dei dati, che consente l'individuazione di espressione genica differenziale e

l'analisi di *clustering* e l'analisi funzionale grazie ai nuovi approcci della *gene ontology*.

Il processamento dei dati è in parte automatizzato grazie al software Feature Extraction, il quale, per estrarre i dati grezzi di intensità del segnale e del background, effettua automaticamente il *gridding* (ossia l'identificazione della posizione di ogni singolo spot), la *segmentation* (definisce i pixel appartenenti al *foreground* e quelli appartenenti al *background*) e l'estrazione dell'intensità del segnale (calcolata come media dei singoli pixel), oltre a fornire anche un resoconto sulla qualità del vetrino, detto *QC report* (Fig.8) utilizzato allo scopo di determinare la qualità dell'ibridazione nel microarray e dei dati grezzi, e quindi la possibilità di proseguire le analisi. In particolare si valuta la distribuzione spaziale degli *outlier* (che dovrebbe essere uniforme e non presentare addensamenti), la presenza di eventuali gradienti di intensità del segnale (grazie all'algoritmo di *detrending* RMS_Resid), lo stato dei controlli negativi (ampie variazioni del segnale potrebbero indicare basse prestazioni dell'algoritmo di *gridding* o una forte componente di rumore), la qualità delle repliche intra-vetrino (si valuta il coefficiente di variazione mediano del segnale processato, ossia ripulito dal background) e la riproducibilità sulle eventuali repliche.

Ulteriori analisi di controllo della qualità sono state effettuate indipendentemente dai *QC report* forniti da Feature Extraction, e si riferiscono direttamente ai dati di intensità estratti dal vetrino: esistono diversi tipi di segnale che vengono attribuiti ad ogni spot, ma per le analisi che seguono sono stati considerati esclusivamente i seguenti:

- Il *Mean Signal*: è il segnale "grezzo" dello spot ricavato dalle intensità dei pixel "inlier";
- Il *Processed Signal*: è il segnale ottenuto dall'algoritmo di Feature Extraction ripulito dal segnale di background (considerando, qualora selezionato, il *detrending*);
- Il *Total Probe Signal*: è la media dei processed signal di ogni probe replicata;
- Il *Total Gene Signal*: è la somma dei total probe signal per ogni gene.

Dato che questi segnali possono ottenere anche valori negativi è stato loro aggiunto un valore costante, chiamato offset, e sono stati trasformati su scala logaritmica applicando il logaritmo in base 2. Con tali dati sono stati costruiti dei *boxplot* e dei *density plot*, per valutare che la distribuzione delle intensità fosse omogenea in tutti gli array analizzati e presentasse medesima forma e range di valori.

È stata determinata, inoltre, anche l'intensità relativa di ogni spot dell'array rispetto alla mediana dei valori del medesimo spot su tutti gli array analizzati (*Relative Log Expression*): se si assume che ci sia un'alta percentuale di geni non differenzialmente espressi, la maggior parte di questi valori dovrebbe essere prossima allo zero. Infine, per i segnali considerati sono stati creati gli MvA plot, i quali consentono di visualizzare, per ogni array del dataset, la differenza tra i valori di intensità

degli spot nell'array osservato e il corrispondente valore mediano calcolato su tutti gli array (in ordinata) contro la media tra i valori dell'array e il valore mediano (in ascissa). Se si assume che la maggior parte degli spot corrispondano a geni non differenzialmente espressi, non dovrebbero risultare variazioni evidenti tra l'array osservato e l'array "mediano", e quindi la nuvola di punti dovrebbe essere attorno a $M=0$.

Per la normalizzazione dei dati è stata utilizzata la funzione loess: questo metodo si basa sui valori calcolati per gli MvA plot (media e differenza), e permette di ottenere una curva che approssimi al meglio la non linearità legata ad eventuali trend presenti nel plot. Applicando l'inversa di tale curva ai valori di intensità si può così compensare l'effetto della distorsione. Tale funzione ha lo scopo di rendere simili le distribuzioni dell'intensità degli spot tra array diversi e si basa sull'ipotesi che la maggior parte dei geni non dovrebbe avere intensità diverse in un array rispetto ad un altro. In base all'esito di questa fase di processamento dei dati si è proceduto con la fase di analisi dei dati, per la quale sono stati considerati soltanto gli spot che presentavano un segnale confrontabile per tutti in tutte le differenti condizioni sperimentali. Per identificare i miRNA con espressione differenziale nelle cellule infettate con i vettori retrovirali rispetto a quelle di controllo, è stato usato il test statistico SAM (*significant analysis of microarray data*). In un primo momento, per la selezione dei miRNA statisticamente significativi si è adottato un P-value < 0.05 , il quale è stato successivamente modificato applicando il metodo di correzione della *False Discovery Rate* (FDR), grazie al quale è stata incrementata la stringenza della selezione. Tutti gli esperimenti sono stati fatti in quadri plicato ed ogni replica consiste in una replica biologica in sé. Per motivi tecnici sono state fatte anche delle repliche tecniche in modo che tutte le quattro repliche biologiche fossero idonee per essere analizzate dopo l'esperimento con gli microarray. I campioni analizzati sono riportati nella tabella 3.

Tabella 3. Campioni utilizzati per l'analisi mediante miRNA microarray.

Cheratinociti umani (HFK)	HFK-HPV16E6	HFK-HPV16E7	HFK-HPV6E6	HFK-HPV6E7	HFK-CTRL
Fibroblasti umani (HFF)	HFF-HPV16E6	HFF-HPV16E7	HFF-HPV6E6	HFF-HPV6E7	HFF-CTRL
Linee tumorali cervicali	CaSki	SiHa	C33A		

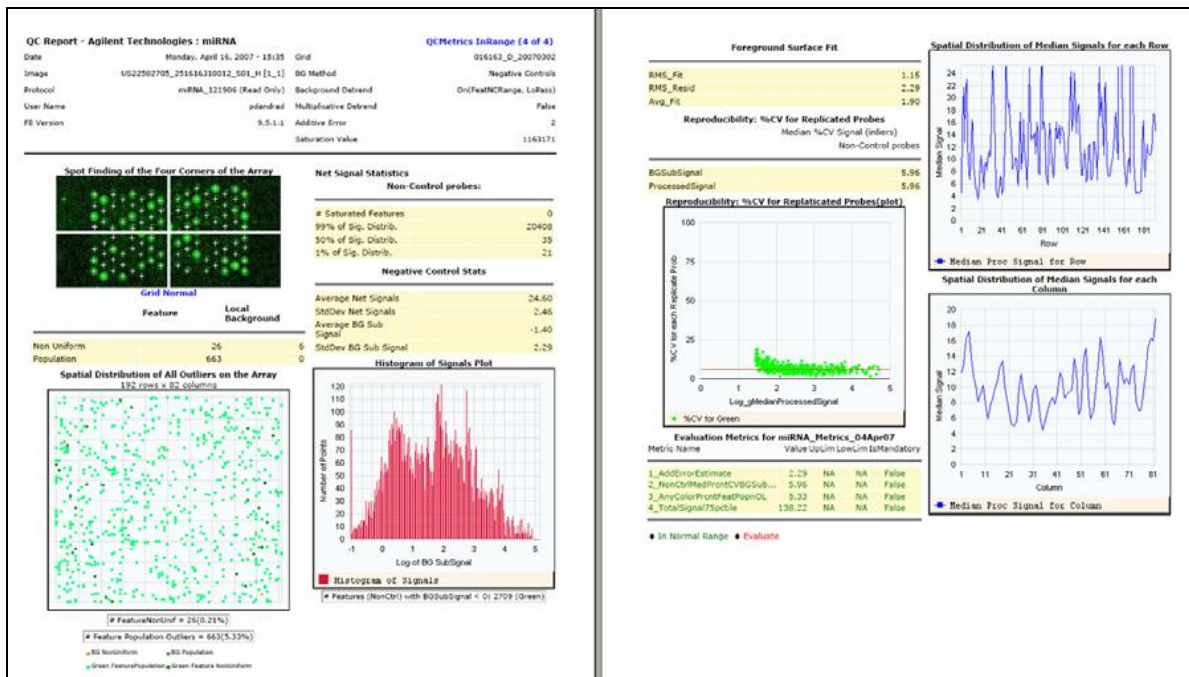


Fig.8 Esempio di QC report per un miRNA microarray 8x15K, generato da Feature Extraction Software FE .

6. ANALISI DEL PROMOTORE DEL MIR146A

6.1 Predizione di putativi siti di legame dei fattori di trascrizione sul promotore del miR-146a tramite un software specifico.

Il software **MATCH (Matrix Search for Transcription Factor Binding Sites)** è un software specifico per la predizione della presenza di putativi siti di legame su una sequenza di interesse. Utilizzando come sequenza di analisi la sequenza del promotore del miR-146a clonata dentro il plasmide A547 (miR-146a promoter) ed il software specifico MATCH abbiamo ottenuto una serie di sequenze di una lunghezza di circa 15pb come possibili siti di legame per alcuni fattori di trascrizione. La figura 9 riporta la sequenza del promotore del miR-146a ed alcuni dei siti di legame con i corrispettivi fattori di trascrizione.

>A547 (miR-146a promoter) Sequencing Result, 565 bp



Fig.9 Rappresentazione schematica della sequenza del promotore del miR-146a e dei putativi siti di legame con i corrispettivi fattori di trascrizione.

6.2 Mutagenesi.

La mutagenesi *in vitro* è una tecnica ampiamente diffusa per lo studio delle dinamiche di interazione tramite le strutture proteiche, per studiare elementi di espressione genica ed in fine per ottenere delle modifiche sui vettori di interesse. I plasmidi miR-146a promoter Oct-1 e miR-146a promoter IRF3/IRF7 descritti nel paragrafo 1.Plasmidi sono stati ottenuti mutando la sequenza normale del vettore miR-146a promoter nei siti di legame del fattore di trascrizione Oct-1 ed IRF3/IRF7. Utilizzando quindi il QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Agilent Technologies) sono stati inseriti dei mutazioni puntiformi in ambedue i filamenti della sequenza del vettore target. Il protocollo del QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit consiste in tre fasi distinte rappresentate nella figura 10. Nella prima fase avviene la sintesi del filamento contenente la mutazione desiderata tramite la denaturazione del template, l'allineamento dei primers contenenti la mutazione desiderata per poi seguire l'estensione e l'incorporazione dei primer tramite la DNA-polymerase high-fidelity (*PfuUltra* HF DNA polymerase). Si tratta di una DNA-polimerasi altamente specifica con una percentuale di errori molto bassa. La mix della reazione per la sintesi dei filamenti mutanti contiene: 5µl di buffer 10x; 25ng di dsDNA template; 125 ng di ciascun primer senso e antisenso; 1µl di dNTPs; 2µl *PfuUltra* HF DNA polymerase e alla fine H₂O fino a 50 µl di volume. La seconda fase consiste nella digestione del DNA metilato e semimetilato tramite l'enzima di restrizione specifico *Dpn I*. L'ultima fase consiste nella trasformazione del nuovo plasmide utilizzando delle cellule competenti di *E.coli*.

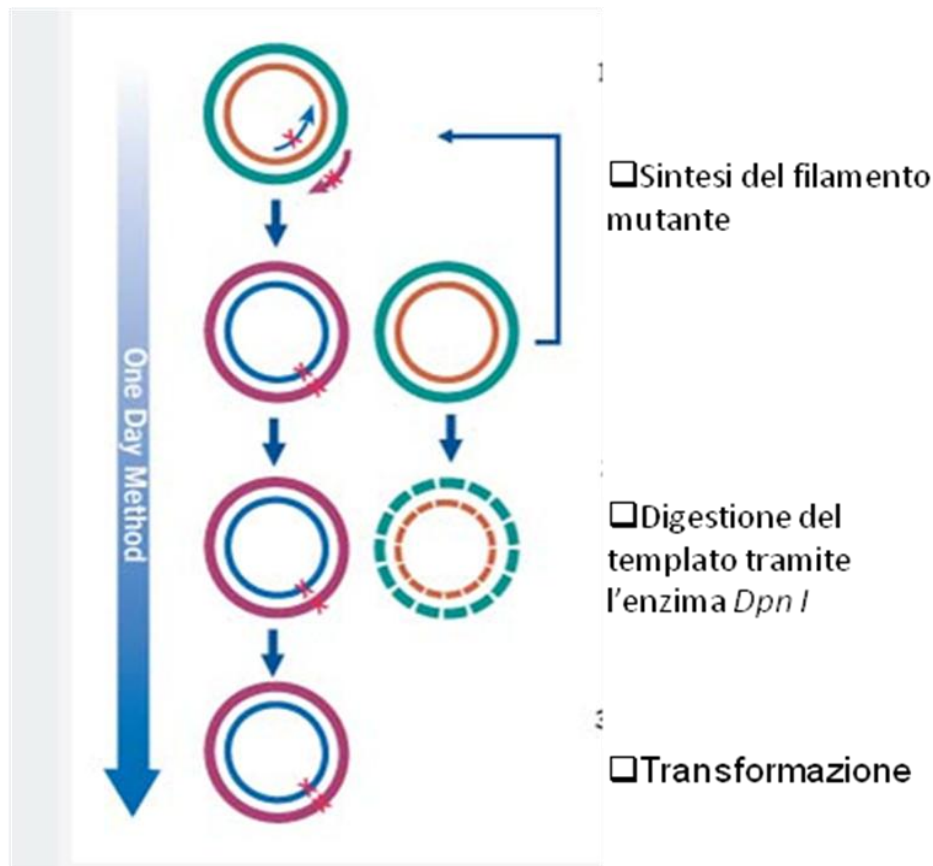


Fig.10 Rappresentazione schematica del metodo della mutagenesi.

6.3 Plasmidi.

I plasmidi utilizzati per la trasfezione transiente e la trasfezione stabile sono stati forniti dalla ditta *Addgene* (Cambridge, MA) e modificati tramite mutagenesi. I plasmidi derivano dai pGL3 Luciferase Reporter Vectors. Questi vettori contengono una regione codificante la *firefly* luciferasi (*Photinus pyralis*), modificata in modo da ottimizzare il monitoraggio della trascrizione nelle cellule eucariotiche trasfettate, a valle di un sito di policlonaggio dove viene inserita la sequenza del promotore di interesse. Nella figura 11 viene riportata la mappa circolare del vettore Pgl3basic. Per questo studio abbiamo utilizzato i seguenti plasmidi: Pre-miR-146a (Addgene) il quale contiene la sequenza del pre-miR-146a nella regione codificante, la resistenza alla neomicina ed il gene della *firefly* luciferasi; A547 (miR-146a promoter) (Addgene) questo plasmide contiene la sequenza del promotore del miR-146a nella regione codificante; miR-146a promoter NFkBm2 (Addgene Cambridge, MA.) il quale contiene la sequenza del promotore del miR-146a mutato nei due siti di legame del fattore di trascrizione NFkB. Mutando dei siti di legame specifici sul promotore normale del miR-146a tramite il QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (vedi paragrafo *Mutagenesi*) abbiamo ottenuto i seguenti plasmidi: miR-146a promoter Oct-1 il quale contiene la sequenza del promotore del miR-146a mutata nel sito di legame del fattore di trascrizione Oct-1, la resistenza

alla neomicina ed il gene esprime l'enzima *firefly* luciferasi ed miR-146a promoter IRF3/IRF7 il quale contiene la sequenza del promotore del miR-146a mutata nel sito di legame dei fattori di trascrizione IRF3 ed IRF7 e come tutti gli altri plasmidi utilizzati in questo studio deriva dal plasmide di base pGL3 Luciferase Reporter Vectors. Il sito di legame dei fattori di trascrizione IRF3 ed IRF7 si sovrappone parzialmente.

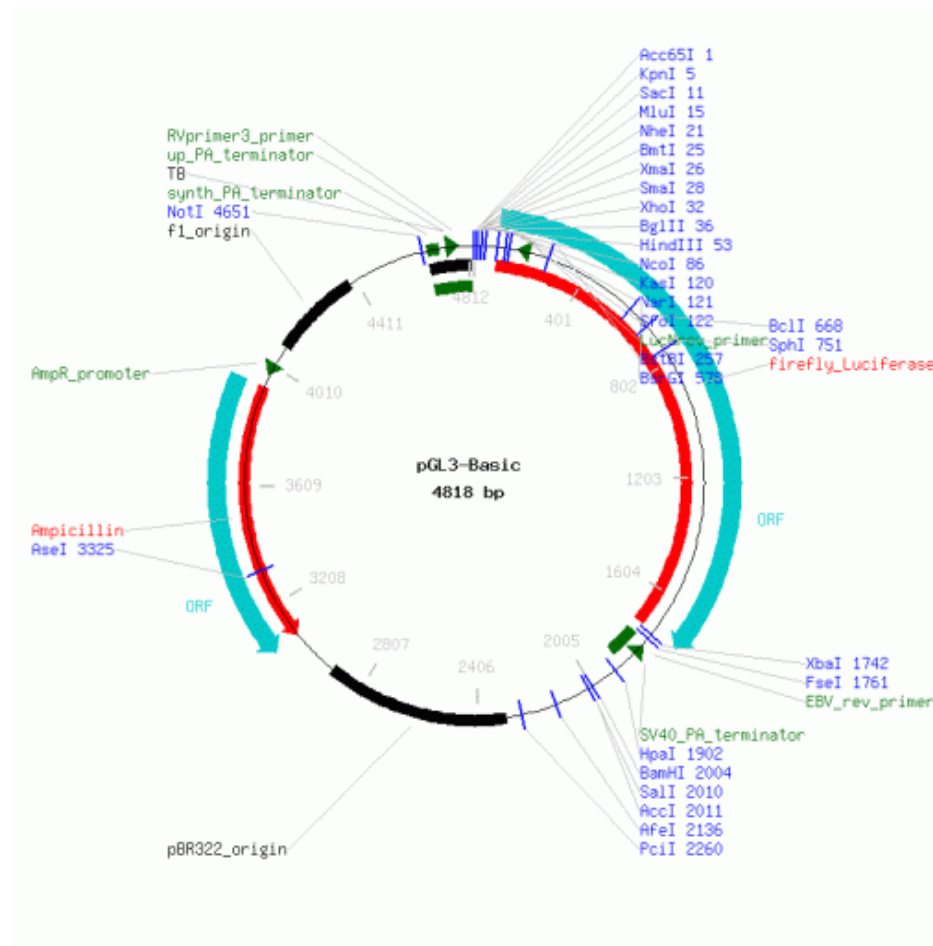


Fig.11 Mappa circolare del pGL3 Luciferase Reporter Vector.

6.4 Espansione dei plasmidi.

A partire dalle colonie positive e correttamente trasformate, è stata eseguita la maxiprep dei plasmidi per ottenerne una concentrazione sufficiente ed adeguata ad effettuare la trasfezione di colture cellulari. E' stato eseguito il mini inoculo in 2 ml di LB con ampicillina (100 µg/ml), seguito da un'incubazione overnight a 37°C; il giorno dopo a partire dal mini inoculo è stato preparato il maxi inoculo in 250 ml di LB con ampicillina (100 µg/ml), il quale è stato incubato overnight a 37°C in agitazione. L'estrazione e la purificazione del plasmide sono state eseguite secondo il

protocollo Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Germania), seguite dalla quantificazione spettrofotometrica al NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer.

6.5 Sintesi dei primer per la mutagenesi.

Seguendo il protocollo QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Agilent Technologies) ed usando la sequenza del promotore del miR-146a abbiamo disegnato la sequenza dei primers contenenti le mutazioni desiderate per poi inserirli nel sito di legame specifico dei fattori di trascrizione Oct-1, IRF3/IRF7 ed c-Myc. Per poter ottenere l'abolizione completa del riconoscimento dei siti di legame dei fattori di trascrizione sulla sequenza specifica sono stati inseriti 5-6 mutazione puntiformi per ogni sito. I primer utilizzati per la mutagenesi vanno disegnati in modo tale che la loro temperatura di melting $T_m \geq 78^\circ\text{C}$, devono essere lunghi tra 25 e 45 pb e la mutazione desiderata deve trovarsi circa nel mezzo della lunghezza del primer. Tali primer devono avere un 40% di GC come minima percentuale e devono finire con una ò piu purina (G/C). Per calcolare la T_m si usa la seguente formula $T_m = 81.5 + 0.41(\%GC) - (675/N) - \% \text{ mismatch}$ dove N è la lunghezza dei primers in basi. I primer utilizzati sono riportati nella tabella 4.

Tabella 4. Sequenze dei primer usati per la mutagenesi.

Nome primer	Sequenza primer	$T_m^\circ\text{C}$	Numero mutazioni puntiformi	Lunghezza primer
Oct-1 mut F	GGCAGCTAAGGCCTATTT <u>CCCGCGGCTTTT</u> TATTCCAT TTCCACAC	79,23	5	45
Oct-1 mut R	GTGGAAATGGAATAAAAGCCT <u>TCGAG</u> AAATAGGCCTT AGCTGCC	79,23	5	43
IRF3/IRF7 mut F	GCATATGCTTTTATTCCAC <u>CGGCACACC</u> CTGCACGCT AACCTC	80	4	44
IRF3/IRF7 mut R	GAGGGTTAGCTGCAGGGTGT <u>CCGGT</u> GGAATAAAA GCATATGC	80	4	43
c-Myc mut F	CGGGGACCCTCTTGCAGGT <u>GAG</u> TCAGGAGCAGCC TGGTG	82.51	4	40
c-Myc mut R	CACCAGGCTGCTCCTGACT <u>TCCAC</u> CTGCAAGAGGGTC CCCG	82.51	4	40

6.6 Trasfezione transiente dei cheratinociti stabilmente infettati e test della luciferasi.

Le cellule dei cheratinociti umani stabilmente infettate con i vari vettori retrovirali (HFK-16E6, HFK-16E7, HFK-6E6, HFK-6E7 ed HFK) prodotti dalle cellule di packaging ed anche i cheratinociti non infettati sono stati trasfettati in modo transiente utilizzando il FuGENE HD Transfection Reagent (Promega Corporation, Madison, WI, USA) secondo il protocollo del FuGENE[®] HD Transfection Reagent. I plasmidi utilizzati per la trasfezione transiente sono stati descritti nel paragrafo 1. Plasmidi e riassumendogli sono i seguenti: A547 (miR-146a promoter), miR-146a promoter NFkBm2, miR-146a promoter Oct-1, miR-146a promoter IRF3/IRF7. Le cellule sono state seminate in piastre da 96-pozzetti seminando 5000 cellule per pozzetto con del mezzo di crescita privo di antibiotici e al 5% di siero bovino (FBS). 24-ore dopo la semina le cellule vanno trasfettate e 48-ore dopo è stato effettuato il test della luciferasi utilizzando il kit della ONE-Glo[™] Luciferase Assay (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Il protocollo ONE-Glo[™] Luciferase Assay è basato nella reazione che viene catalizzata dalla *firefly* luciferasi in presenza di ATP e luciferina. La reazione avviene in due fasi presentate nella figura 12. Nel ultima fase uno dei prodotti della reazione è la luce, la quale va misurata da un luminometro ed è direttamente proporzionale alla espressione della sequenza di interesse contenente dentro lo stesso plasmide che esprime anche la firefly luciferasi utilizzata come gene reporter. Nel nostro laboratorio è stato utilizzato un luminometro DML 2000[™] (Diagene, Qiagen SpA).

- luciferina + $ATP \rightarrow$ luciferil adenilato + PP_i
- iadenilato + $O_2 \rightarrow$ oxiluciferina + AMP + luce

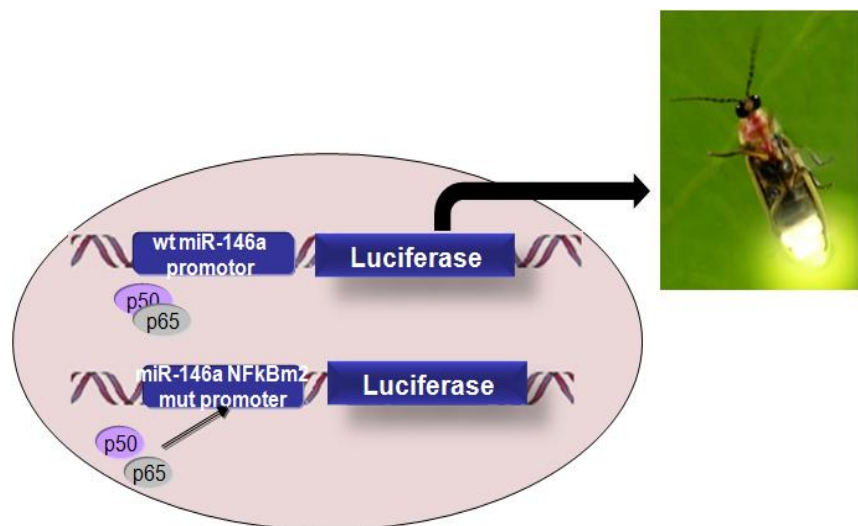


Fig.12 Saggio della luciferasi.

7. STUDIO DELL'ATTIVITA' DEL MIR-146A.

7.1 Trasfezione stabile di miR-146a in cheratinociti primari e in linee di cervico-carcinoma.

La trasfezione stabile col vettore pGL3 Luciferase Reporter Vector contenente la sequenza del pre-miR-146a è stata fatta sui cheratinociti umani normali e sulle due linee tumorali cervicali positive per HPV (CaSki e SiHa) utilizzando il reagente di trasfezione FuGENE HD Transfection Reagent (Promega Corporation, Madison, WI, USA) secondo il protocollo del FuGENE[®] HD Transfection Reagent. Le cellule tumorali SiHa e CaSki sono state seminate in pozzetti da 6-well con un numero di 250.000 cellule per pozzetto. Circa 24 ore dopo la semina sono state trasfettate col plasmide contenente la sequenza di espressione del pre-miR-146a e la resistenza alla neomicina (Geneticin[®] Selective Antibiotic, (G418 Sulphate); Gibco[®]). Passate 48-ore dopo la trasfezione, le cellule sono state messe in selezione con terreno di coltura contenente 800 µg/ml di G418 per tutto il tempo che si trovano in coltura in modo che mantengano il vettore esprimente il pre-miR-146a. Un numero di 50.000 cheratinociti primari umani sono stati seminati in piastre da 6-well, e trasfettati come descritto sopra per le cellule tumorali. 48-ore dopo la trasfezione, il mezzo di coltura va sostituito col terreno contenente 200 µg/ml di G418 (Sigma). Il terreno con l'antibiotico di selezione va aggiunto anche nei pozzetti seminati con lo stesso numero di cellule nello stesso tempo ma non trasfettati col plasmide contenente la selezione per tutte e tre le linee cellulari. In tale caso le cellule vanno in apoptosi entro una settimana circa. Per confermare l'espressione del miR-146a abbiamo estratto del RNA totale dalle cellule selezionate e poi fatta una retro-trascrizione ed in seguito una real-time specifica utilizzando il kit TaqMan[®] MicroRNA Assay (Applied Biosystems) contenente i primer specifici per il miR-146a.

7.2 Test della proliferazione cellulare: Saggio della BrdU.

Il grado di proliferazione delle cellule stabilmente trasfettate (HFK, CaSki e SiHa) è stato valutato utilizzando il CHEMICON[®]'s BrdU Cell Proliferation Assay Kit (Millipore). Questo test consiste nel andare a misurare la quantità della 5-bromo-20-deossi-uridina (BrdU) incorporata nel DNA cellulare tramite un saggio di immunoistochimica. Le cellule sono state coltivate ad una confluenza di 40-50% nelle comuni piastre di plastica da 96 pozzetti (96-well) per poi essere incubate con 20µl di BrdU STOCK 500X diluito 1:500 per 20 ore a 37°C in atmosfera al 5% CO₂. Durante l'incubazione la BrdU viene incorporata sul DNA delle cellule attive dal punto di vista proliferativo e la BrdU incorporata viene rilevata tramite un anticorpo primario contro questa molecola, il quale a sua volta viene riconosciuto da un anticorpo secondario (Goat anti-mouse IgG) coniugato con della

perossidasi. L'aggiunta del substrato della perossidasi produce un pigmento di colore blu scuro. La reazione viene fermata dopo 30 min di incubazione al buio con una soluzione fornita dal BrdU Cell Proliferation Assay Kit. In questo punto i pozzetti positivi per l'incorporazione della BrdU diventano gialli. La reazione colorimetrica viene rilevata spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di 492 nm, utilizzando un lettore di assorbanza per piastre a 96 pozzetti *Sunrise* (Tecan, Svizzera). Gli esperimenti sono stati svolti in 7 repliche.

7.3 Test della vitalità cellulare: Saggio MTT.

La vitalità delle cellule stabilmente trasfettate (HFK, SiHa e CaSki) è stata valutata usando il saggio colorimetrico MTT (Sigma, München, Germany). Il saggio MTT (*bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio*) è un saggio colorimetrico standard che misura la capacità degli enzimi mitocondriali ed in particolare della succinato deidrogenasi, di ridurre l'MTT in formazano dando alla sostanza un colore blu/violaceo. L'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi, è attivo infatti soltanto nelle cellule vive, e la sua funzione consiste nel tagliare l'anello di tetrazolio dell'MTT (sostanza di colore giallo) con la formazione, di conseguenza, di formazano (un sale blu). In questo studio le cellule sono state coltivate ad una confluenza di 50 % nelle piastre da 96 pozzetti e poi incubate con 10 µl di 5 mg/mL MTT per 4 ore a 37°C in atmosfera al 5% CO₂. La concentrazione dei cristalli di formazano (indicatori del numero delle cellule vitali) è stata determinata usando il saggio colorimetrico in accordo con le istruzioni del protocollo MTT colorimetric assay (Sigma, München, Germany). Tale reazione è misurata mediante la lettura spettrofotometrica del campione, alla lunghezza d'onda di 620 nm. Ogni singolo esperimento è stato svolto in sei repliche.

7.4 Saggio di migrazione cellulare.

Per determinare l'effetto dell'espressione del miR-146a sulla capacità migratoria delle cellule stabilmente trasfettate (HFK, SiHa e CaSki) è stato effettuato il saggio della migrazione cellulare utilizzando i filtri transwell (Costar, Cambridge, MA) con una dimensione dei pori di 8 μm . Tali filtri vengono trattati con del collagene del tipo I in modo da formare una specie di rivestimento nella parte posteriore del filtro. Il collagene serve per stimolare la migrazione delle cellule seminate nel strato anteriore del filtro visto che la maggiore parte delle cellule contengono recettori che riconoscono tale molecola sulla loro membrana. Le cellule sono state seminate sul transwell il quale a sua volta si immerge nei pozzetti delle piastre di plastica da 12-well. Il terreno dentro il pozzetto della piastra da 12 well contiene una concentrazione di FBS circa doppia rispetto al terreno contenuto dentro il transwell. Tale differenza di concentrazione serve per stimolare la migrazione delle cellule seminate sul transwell. Il numero delle cellule seminate sul transwell ed il tempo di incubazione cambia secondo il tipo cellulare. Le cellule tumorali Caski e Siha sono simili come linee cellulari, sono tutte due cellule tumorali con un alto grado di proliferazione cellulare, di forma piccola e rotonda in particolare le Caski mentre le Siha sono un pochino più piatte ma sempre piccoline. Il numero delle cellule tumorali seminate su ciascun transwell è di 150,000 cellule e il tempo di incubazione è di 8 ore a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂. Per quanto riguarda i cheratinociti stabilmente trasfettati e quelli normali, essendo delle cellule di coltura primaria di forma allungata ed estesa, sono cellule che hanno molto più citoplasma e dei lembi che sporgono. I cheratinociti sono stati seminati circa 40.000 cellule per pozzetto ed incubati per 24 ore a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂. Importane notare che per ogni esperimento sono state seminate lo stesso numero di cellule, incubate per lo stesso tempo e nelle stesse identiche condizioni sia le cellule stabilmente trasfettate sia quelle normali della stessa linea cellulare. Le cellule migrate sono state fissate con nella formalina per circa un ora, poi lavate due volte col PBS e alla fine colorate per circa 2 ore in ematossilina. Utilizzando un cotton fioc si puliscono le cellule non migrate che si trovano sul filtro dalla parte superiore dove sono state seminate. Il filtro si taglia poi con attenzione e si monta sul vetrino con glicerolo al 70%. Tali cellule sono state contate al microscopio ottico (Leica) contando lo stesso numero di aree visive distribuite uniformemente sul vetrino per ogni singolo esperimento. Il numero definitivo delle cellule per area/vetrino costituisce la media del numero delle cellule di tutte le 10 aree del vetrino. Ogni esperimento è stato fatto in triplicato.

STUDIO SU CAMPIONI DI CELLULE CERVICALI

1. Campioni.

Lo studio è stato condotto su 63 tamponi cervico-vaginali ottenuti da donne di età compresa tra 17 e 56 anni (età media 34,5 anni), prelevati presso gli ambulatori dell'U.O.C. di Microbiologia e Virologia dell'Università-Azienda Ospedaliera di Padova. Le cellule epiteliali del collo dell'utero, prelevate tramite *brush* cervicale, sono state sospese in soluzione fisiologica e divise in due aliquote. Un' aliquota è stata utilizzata per l'estrazione del DNA e la ricerca dell'HPV-DNA tramite reazione a catena della polimerasi (*polymerase chain reaction*, PCR) e sequenziamento, l'altra per la purificazione dell'RNA e l'analisi d'espressione di miRNA.

2. Purificazione del DNA.

Per la purificazione del DNA è stato utilizzato, secondo il protocollo, il kit di estrazione QIAamp® DNA mini kit (QIAGEN GmbH), che fa uso di colonnine con membrana di gel di silice. Il DNA estratto è stato quantificato tramite lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 260 nm, alla quale gli acidi nucleici assorbono maggiormente, mediante lo strumento NanoDrop ND 1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies). La quantità del DNA è stata anche stimata mediante amplificazione con PCR del gene *BGL* (Tab.5), codificante la β -globina umana e presente in ogni cellula in due copie.

Tabella 5 . Sequenze dei primer e delle sonde impiegati nelle reazioni di PCR e real-time PCR

Target	Primer senso	Primer antisenso	Sonda TaqMan™
<i>Real-time PCR</i>			
HPV-16	5'-TGACCACGACCTACCTCAACAC-3'	5'-CCAATAAGTTTGGTTTCCTGACA-3'	5'-CCAGCCGCTGTGTAT-3'
<i>PCR e sequenziamento</i>			
<i>BGL</i>	5'-ACACAACCTGTGTTCACTAGC-3'	5'-CAACTTCATCCACGTTTCACC-3'	
HPV, L1 (MY09/MY11)	5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'	5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3'	
HPV, L1 (GP5+/GP6+)	5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3'	5'-GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3'	

3. Determinazione di sequenze virali mediante PCR.

La determinazione di sequenze di HPV è stata eseguita mediante due sistemi di PCR impiegando nella prima reazione di amplificazione i primer degenerati MY09/MY11, riportati da Manos e coll. (1989) nella seconda amplificazione i primer consensus GP5+/GP6+, riportati da Jacobs e coll. (1997) (vedi Tab. 5). Sia i primer MY09/MY11 sia i primer GP5+/GP6+ riconoscono regioni del gene L1 molto conservate in tutti i genotipi di HPV. I primer MY09/MY11 amplificano una sequenza di 450 bp e contengono basi degenerate per compensare le differenze di sequenza tra i diversi tipi virali. I primer consensus GP5+/GP6+ sono invece costituiti da una sola coppia di primer che mappa in una regione conservata della lunghezza di 150 bp, ma che è pienamente complementare ad un solo o a pochi genotipi. Perchè possa essere riconosciuto un numero maggiore di genotipi, la reazione deve essere condotta ad una bassa temperatura di annealing (40 °C) (Jacobs *et al.*, 1997).

4. Estrazione di RNA. Per l'estrazione dell'RNA totale, a partire da cellule epiteliali del collo del utero, in questo studio è stato utilizzato un metodo tradizionale per l'estrazione di RNA con Tri-reagent (TRIzol LS Reagent, Invitrogen). Si tratta di un metodo di purificazione basato sulla combinazione di estrazione/precipitazione e centrifugazione.

5. Analisi d'espressione dei microRNA

Per l'analisi d'espressione dei miRNA ci si è avvalsi di kit TaqMan[®] MicroRNA Assay (Applied Biosystems), che consentono una accurata determinazione dei miRNA maturi. Il protocollo del kit prevede una fase di retro-trascrizione che utilizza specifici miRNA-RT primer, ed una quantificazione tramite real-time PCR. E' stata eseguita una quantificazione relativa dell'espressione dei miRNA, calcolata con il metodo $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak *et al.*, 2001).

6. Normalizzazione con un controllo endogeno.

Usando un metodo comparativo basato sui Ct, è necessario utilizzare un controllo endogeno per normalizzare i livelli d'espressione del gene target e per correggere le differenze di quantità del cDNA caricato nella reazione di PCR. Per normalizzare i campioni di RNA totale umano, è necessario selezionare un controllo endogeno espresso costitutivamente. Nel nostro studio sono stati scelti due miRNA in base a caratteristiche di basso Ct e bassa deviazione standard (StDev_{CT}) nei diversi tessuti, frequenza di utilizzo in precedenti lavori: RNU6, RNU48.

7. Analisi statistica.

I risultati sono riportati come media \pm deviazione standard. I confronti tra gruppi sono stati eseguiti con test *t* di Student a due code per dati non appaiati. La quantificazione relativa dei miRNA è stata eseguita con metodo $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak *et al.*, 2001).

STUDIO SU TESSUTI DEL CARCINOMA SQUAMOCELLULARE DEL PENE

1. Campioni

Lo studio è stato condotto in 59 campioni inclusi in formalina e paraffinati di carcinoma squamocellulare del pene recuperati dagli archivi della Unita di Patologia del Università di Padova. I campioni appartenevano a pazienti ricoverati presso l'Azienda Ospedaliera di Padova nel periodo da gennaio 2002 a dicembre 2010. L'età media dei pazienti era 66 anni ed era compresa tra 44 e 87 anni. Un secondo gruppo di 8 campioni di condiloma sono stati recuperati come campioni di controllo, da pazienti maschi di età compresa tra 26 e 60 anni (età media 42 anni). La diagnosi sono state fatte secondo i criteri del WHO (World Health Organization).

2. Analisi immunoistochimica (IHC) dell'espressione di p53 e di p16INK4a.

L'espressione di p16INK4a e p53 nei campioni paraffinati dei tessuti tumorali è stata fatta mediante immunoistochimica diretta in sezioni di tessuto di 4 μ m di spessore, utilizzando gli anticorpi primari p53 (monoclonal mouse anti-p53; clone DO-7; Dako Italia S.p.A) e p16INK4 (monoclonal mouse anti-p16; clone JC8; Santa Cruz, California, U.S.A). Le sezioni sono state poi leggermente controcolorate con ematossilina. Appropriati controlli negativi e positivi sono stati colorati in contemporaneamente.

La colorazione col p53 è stata definita positiva solo se $\geq 75\%$ delle cellule riportavano una forte colorazione del nucleo, cosa che riflette l'accumulo nucleare di p53 in presenza di una mutazione inattivante (Van Monsjou HS *et al.*, 2011). Per la valutazione dell'espressione del p16 è stato seguito un approccio morfologico basato sul modello proposto da Cubilla *et al.*, 2011. Brevemente, le reazioni immunoistochimiche sono state classificate in quattro gruppi in base alla topografia della colorazione delle cellule, intensità, e la percentuale delle cellule positive: 0= assenza di colorazione per la p16 in tutte le cellule neoplastiche, 1= presenza di colorazione per p16 solo in alcune cellule neoplastiche isolate e disperse, 2= colorazione in gruppi di cellule neoplastiche sparse e disomogenee e 3= colorazione fitta e continua sia nel citoplasma che nel nucleo di tutte le cellule

neoplastiche (Cubilla AL et al., 2011). Solo le reazioni classificate nel gruppo 3 sono state considerate indicative per la sovraespressione di p16INK4a.

3. Estrazione del DNA, ricerca e genotipizzazione di HPV.

Il DNA genomico è stato estratto da piccole quantità di tessuto ottenuto dal microsezionamento dei blocchetti di paraffina seguendo il protocollo fornito dal QIAamp BioRobot kit e sospeso in 100µl di eluato. Cinque microlitri del DNA eluato sono stati utilizzati per l'amplificazione tramite PCR utilizzando il kit INNO-LiPA HPV Genotyping Extra assay (Innogenetics). I prodotti biotinilati della PCR sono stati genotipizzati mediante l'ibridazione con delle sonde di oligonucleotidi specifici per diversi genotipi di HPV, legati su membrane di nitrocellulosa. La rilevazione della reazione colorimetrica viene fatta tramite un strumento Auto-LiPA 48, in accordo con il protocollo del fornitore. Dopo il rilevamento della reazione colorimetrica, le strisce sono state analizzate mediante scanner e il software specifico per la lettura e l'analisi delle strisce, LiRAS (Line Reader and Analysis Software). Tutti i risultati sono poi confermati con la lettura visiva dell'operatore. La rilevazione e la genotipizzazione di HPV è stata anche determinata tramite real-time PCR specifica per diversi tipi di HPV, la quale permette di determinare il numero di copie del genoma virale nei campioni HPV positivi. Le sequenze dei primers e della sonde usate nella real-time PCR sono riportati nella Tabella 6B.

4. Estrazione di RNA, trascrizione inversa e real-time PCR.

Piccole quantità di tessuto ottenute tramite microsezionamento dei blocchetti di tessuti tumorali paraffinati per ogni campione tumorale sono stati deparaffinizzati in xilene a 50°C per 3 min. Per l'estrazione di RNA totale è stato usato il RecoverAll kit (Ambion, Austin, Texas, USA) seguendo il protocollo del fornitore. Per la determinazione e la quantificazione dei microRNA maturi hsa-miR-145, hsa-miR-146a, hsa-miR-23b, hsa-miR-218, hsa-miR-196a, hsa-miR-34a, and hsa-let-7c (sequenza dei primer nella Tabella 6A) è stato usato il metodo NCode™ miRNA qRT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) su un termociclatore a fluorescenza LightCycler 480 Real Time PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). I risultati sono stati normalizzati facendo riferimento all'espressione del microRNA *house-keeping* RNU6B (Invitrogen; sequenza dei primers si trova nella Tabella 6A). Tutte le reazioni sono state fatte in triplicato, compresi i controlli negativi.

5. Analisi statistica.

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite tramite il software R (R Development Core Team, version 2.9; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). La significatività statistica dei risultati dell'analisi immunostochimica e della qRT-PCR è stata determinata tramite il test non parametrico di Mann Whitney. Un valore di $P < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Table 6A. Primer utilizzati per l'analisi dell'espressione dei microRNA tramite RT-PCR	
miRNA	Primer forward (5'-3')
<i>hsa-miR-145</i>	CAGTTTTCCCAGGAATCCCT
<i>hsa-miR-146a</i>	TGAGAACTGAATTCCATGGGTT
<i>hsa-miR-23b</i>	ATCACATTGCCAGGGATTACC
<i>hsa-miR-218</i>	CGTTGTGCTTGATCTAACCATGT
<i>hsa-miR-196a</i>	GCTAGGTAGTTTCATGTTGTTGGG
<i>hsa-miR-34a</i>	GGCAGTGTCTTAGCTGGTTGT
<i>hsa-let-7c</i>	CGCTGAGGTAGTAGGTTGTATGGTT
miRNA di controllo	
<i>RNU6B</i>	ACGCAAATTCGTGAAGCGTT

Tabella 6B. Primer e sonde utilizzati per la genotipizzazione di HPV tramite RT-PCR

Genotipo	Gene target	Primers/ Sonda	Sequenza degli oligonucleotidi (5'→3')
HPV-16	L1	Forward	TGACCACGACCTACCTCAACAC
		Reverse	CCAATAAGTTTGGTTTTCTGACA
		Sonda	FAM-CCAGCCGCTGTGTAT-MGB
HPV18	E6	Forward	GGACCGAAAACGGTGTATATAA
		Reverse	CAGTGAAGTGTTTCAGTTCGGT
		Sonda	FAM- ATGTGAGAAACACACCACAATACTATGGCG CG-MGB
HPV68	E7	Forward	ACAACAGCGTCACACAATTCAGT
		Reverse	CAGTTCTACGTTCCGCAGGTT
		Sonda	FAM- ACTGCAACTAGTAGTAGAAGCGTCGCGGG- TAMRA
HPV31	E6 LCR	Forward	GAACCGAAAACGGTTGGTATATA
		Reverse	ATCGTAGGGTATTTCCAATGC
		Sonda	VIC- CATAGTATTTTGTGCAAACCTACAGACGCCAT GT-MGB
HPV45	E6 E7	Forward	CAGTGTAATACATGTTGTGACCAG
		Reverse	ACAGGATCTAATTCATTCTGAGGT
		Sonda	NED- CAAGAAAGACTTCGCAGACGTAGGGAAACAC- MGB
HPV33	E6	Forward	GCATGATTTGTGCCAAGCAT
		Reverse	CTCAGATCGTTGCAAAGGTTT
		Sonda	FAM- ACTATACACAACATTGAACTACAGTGCGTGGA ATGC-MGB
HPV52	E6 E7 LCR	Forward	AAACGGTCAGACCGAAACC
		Reverse	CAGCACCTCACACAATTCGT
		Sonda	VIC- AACACAGTGTAGCTAACGCACGGCCATGT- MGB
HPV58	E6	Forward	CACGGACATTGCATGATTTGT
		Reverse	TCAGATCGCTGCAAAGTCTTT
		Sonda	NED-TTTC AATTCGATTT CATGCAC-MGB

RISULTATI

1. Le proteine E6 ed E7 di HPV16, ma non di HPV6, alterano l'espressione di alcuni microRNA nei cheratinociti umani.

Per verificare se le proteine E6 ed E7 di HPV16 e HPV6 sono in grado di modificare l'espressione di microRNA cellulari, sono state utilizzate colture primarie di cheratinociti umani prelevati da prepuzio (HFK) e trasdotti con vettori retrovirali per l'espressione stabile dei geni E6 ed E7 di HPV6 e HPV16 (HFK-HPV16E6, HFK-HPV6E6, HFK-HPV16E7, HFK-HPV6E7 e il controllo HFK-LXSN). L'espressione dei microRNA è stata valutata sia con i microRNA microarray sia con real-time qRT-PCR. L'analisi statistica dei dati ottenuti dai microarray ha identificato una serie di microRNA significativamente alterati da parte di E6 ed E7 di HPV16, mentre nessun microRNA era significativamente alterato da E6 ed E7 di HPV6. L'espressione dell'oncoproteina E6 di HPV16 ha provocato una significativa riduzione del solo miR-34a rispetto ai cheratinociti di controllo HFK-LXSN (Tabella 7).

Tabella 7. Risultati dell'analisi statistica dei microarray. Confronto di cheratinociti HPV16-E6-positivi vs. controllo HFK-LXSN (CTRL).

miRNA	pval.SAM. HPV16.E6vsCTRL	FDR. HPV16.E6vsCTRL	FC. HPV16.E6vsCTRL	Regolazione
hsa-miR-34a	0	0	-5,36	down
hsa-miR-34a	1,56E-05	0,005	-5,31	down
hsa-miR-34a*	0,0001	0,031	-5,45	down
hsa-miR-1278	0,0005	0,079	-1,96	down
hsa-miR-1181	0,0007	0,092	-3,02	down
hsa-miR-1181	0,0012	0,117	-2,81	down
hsa-miR-15a*	0,0021	0,135	1,77	up
hsa-miR-361-3p	0,0021	0,117	-1,84	down
hsa-miR-371-5p	0,0021	0,117	-2,77	down
hsa-miR-371-5p	0,0031	0,118	-2,33	down
hsa-miR-371-5p	0,0031	0,118	-2,33	down
hsa-miR-146a	0,0029	0,126	-1,81	down
hsa-miR-146a	0,0155	0,170	-2,52	down
hsa-miR-34b*	0,0090	0,169	-1,68	down
hsa-miR-34b*	0,0029	0,121	-2,47	down
hsa-miR-502-3p	0,0031	0,104	-2,16	down

hsa-miR-212	0,0032	0,101	-2,40	down
hsa-miR-362-3p	0,0059	0,138	-1,97	down
hsa-miR-520c-3p	0,0081	0,168	-1,47	down
hsa-miR-520d-3p	0,0062	0,140	1,55	down
hsa-let-7f	0,0066	0,146	-1,37	down
hsa-let-7a	0,0084	0,168	-1,41	down
hsa-let-7b	0,0189	0,185	-1,53	down
hsa-let-7e	0,0402	0,185	-1,33	down
hsa-let-7e*	0,0306	0,183	-1,50	down
hsa-let-7g	0,0470	0,185	-1,35	down
hsa-miR-30b	0,0308	0,183	-2,70	down
hsa-miR-30b	0,0402	0,186	-1,73	down
hsa-miR-23b*	0,0165	0,176	-1,79	down
hsa-miR-23b	0,0445	0,187	-1,54	down
hsa-miR-125a-3p	0,0140	0,165	-2,15	down
hsa-miR-455-5p	0,0123	0,156	-1,93	down
hsa-miR-455-5p	0,0288	0,184	-1,77	down
hsa-miR-125a-3p	0,0140	0,165	-2,15	down
hsa-miR-34c-5p	0,0331	0,178	1,43	up
hsa-miR-199a-3p	0,0335	0,180	2,03	up
hsa-miR-204	0,0329	0,179	-2,08	down
hsa-miR-181a	0,0356	0,175	-1,66	down
hsa-miR-181a*	0,0405	0,185	-1,64	down

* L'asterisco indica i miRNA trascritti nella direzione 3'-5', quindi sono i miRNA complementari dei miRNA con lo stesso nome.

Il miR-34a è risultato significativamente down-regolato anche nel confronto tra HFK-HPV16E6 vs. HFK-HPV16E6. Da questo confronto è inoltre emersa una significativa riduzione dell'espressione del miR-1915 nei HFK-HPV16E6 (Tabella 8).

Tabella 8. Risultati dell'analisi statistica dei microarray. Confronto di cheratinociti HPV16-E6-positivi vs. cheratinociti HPV6-E6-positivi.

miRNA	pval.SAM. HPV16.E6vs HPV6.E6	FDR. HPV16.E6vs HPV6.E6	FC. HPV16.E6vs HPV6.E6	Regolazione
hsa-miR-34a	0	0	-6,56	down
hsa-miR-34a	0	0	-5,55	down
hsa-miR-1915	0,0001	0,029	-2,12	down
hsa-miR-1915	0,0001	0,025	-2,15	down
hsa-miR-34b*	0,0003	0,040	-2,01	down
hsa-miR-34b*	0,0003	0,044	-3,07	down
hsa-miR-34a*	0,0004	0,039	-3,94	down
hsa-miR-181d	0,0013	0,106	-4,92	down
hsa-miR-146a	0,0018	0,135	-1,92	down
hsa-miR-146a	0,0117	0,278	-2,56	down
hsa-miR-1249	0,0020	0,137	-1,54	down
hsa-miR-301b	0,0022	0,137	-1,80	down
hsa-miR-135a*	0,0028	0,149	-2,15	down
hsa-miR-744*	0,0031	0,158	-2,25	down
hsa-miR-146b-5p	0,0042	0,199	2,41	up
hsa-miR-515-3p	0,0050	0,200	-1,61	down
hsa-miR-424	0,0051	0,193	1,84	up
hsa-miR-18a	0,0053	0,190	3,19	up

FDR: false discovery rate; FC: fold change.

L'espressione della oncoproteina E7 di HPV16 ha provocato un aumento dell'espressione dei miR-34b, miR-34c-5p, miR-16, e miR-486-5p. I livelli di miR-22* risultavano invece ridotti nelle cellule esprimenti E7 di HPV16 (Tabella 9). Il confronto con i cheratinociti HPV6-E7 positivi ha dimostrato anche una significativa riduzione dell'espressione del miR-29b, e una riduzione del miR-22 ai limiti della significatività del test FDR (Tabella 10).

Tabella 9. Risultati dell'analisi statistica dei microarray. Confronto di cheratinociti HPV16-E7-positivi vs. controllo HFK-LXSN (CTRL).

miRNA	pval.SAM. HPV16.E7vsCTRL	FDR. HPV16.E7vsCTRL	FC. HPV16.E7vsCTRL	Regolazione
hsa-miR-34c-5p	0	0	4,39	up
hsa-miR-486-5p	0	0	2,73	up
hsa-miR-34c-5p	0	0	5,17	up
hsa-miR-22*	3,26E-05	0,005	-2,21	down
hsa-miR-34b	3,26E-05	0,005	4,55	up
hsa-miR-16	0,0003	0,032	1,80	up
hsa-miR-486-5p	0,0003	0,033	2,82	up
hsa-miR-34b*	0,0009	0,070	2,30	up
hsa-miR-34b	0,0019	0,083	2,58	up
hsa-miR-22*	0,0012	0,066	-1,70	down
hsa-miR-22	0,0022	0,092	-1,79	down
hsa-miR-146a	0,0028	0,103	1,42	up
hsa-miR-31	0,0040	0,123	-1,69	down
hsa-miR-155	0,0074	0,131	1,65	up
hsa-miR-15a	0,0095	0,144	1,52	up
hsa-miR-16	0,0126	0,155	1,40	up
hsa-miR-34a	0,0097	0,143	1,39	up
hsa-miR-34a	0,0170	0,157	1,47	up
hsa-miR-23a	0,0102	0,148	-1,49	down
hsa-let-7e	0,0015	0,068	-1,38	down
hsa-miR-204	0,0014	0,076	-4,56	down
hsa-miR-34b*	0,0009	0,070	2,30	up
hsa-miR-34b	0,0019	0,083	2,58	up
hsa-miR-204	0,0014	0,076	-4,56	down
hsa-let-7e	0,0015	0,068	-1,38	down
hsa-miR-218	0,3268	0,326	-1,43	down
hsa-miR-31	0,0040	0,123	-1,69	down
hsa-miR-24	0,0031	0,109	-1,42	down

FDR: false discovery rate; FC: fold change.

Tabella 10. Risultati dell'analisi statistica dei microarray. Confronto di cheratinociti HPV16-E7-positivi vs. cheratinociti HPV6-E7-positivi.

miRNA	pval.SAM. HPV16.E7vs. HPV6.E7	FDR. HPV16.E7vs. HPV6.E7	FC. HPV16.E7vs. HPV6.E7	Regolazione
hsa-miR-34c-5p	0,0001	0,053	2,39	up
hsa-miR-29b	0,0001	0,031	-2,47	down
hsa-miR-22*	0,0003	0,065	-2,50	down
hsa-miR-34c-5p	0,0004	0,051	2,92	up
hsa-miR-22	0,0005	0,061	-2,09	down
hsa-miR-22	0,0006	0,058	-1,57	down
hsa-miR-29c	0,0007	0,059	-1,70	down
hsa-miR-16	0,0010	0,072	2,05	up
hsa-miR-15b	0,0025	0,064	1,95	up

FDR: false discovery rate; FC: fold change.

Il confronto diretto dei cheratinociti esprimenti HPV16-E6 vs. i cheratinociti esprimenti HPV16-E7 ha evidenziato un numero maggiore di microRNA la cui espressione variava in modo significativo, in accordo con l'osservazione che le due oncoproteine virali esercitano un effetto diametralmente opposto sull'espressione di alcuni microRNA cellulari (Tabella 11). Alcuni di questi microRNA risultavano significativi anche al test ANOVA di confronto tra i cheratinociti infettati con i vari vettori retrovirali (evidenziati in rosso nelle tabelle). Il miR-34a è risultato essere nuovamente significativamente downregolato nei cheratinociti HPV16-E6-positivi rispetto a quelli HPV16-E7-positivi. Inoltre, miR-34c-5p, miR-146a, miR-34b, miR-15b, miR-16, miR-486-5p e miR-486-3p erano significativamente meno espressi nei cheratinociti esprimenti la oncoproteina E6 di HPV16 rispetto ai cheratinociti esprimenti la oncoproteina E7 di HPV16. Pochi erano i microRNA sovraespressi nei cheratinociti HPV16-E6-positivi, tra i quali miR-424, miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-369-3p, miR-126, e miR-22.

Riassumendo i dati dell'analisi statistica dei vari confronti possiamo dire che l'espressione delle oncoproteine virali E6 ed E7 di HPV16 (ad alto rischio) modulano significativamente una serie di microRNA cellulari mentre le stesse oncoproteine di HPV6 (basso rischio) non hanno alcun effetto significativo sui microRNA cellulari. Alcuni di questi microRNA cellulari significativamente modificati sono stati valutati anche tramite qRT-PCR per confermare i risultati dei miRNA microarray (Fig.13).

Tabella 11. Risultati dell'analisi statistica dei microarray. Confronto di cheratinociti HPV16-E6-positivi vs. cheratinociti HPV-16-E7-positivi.

miRNA	pval.SAM. HPV16.E6vsHPV 16.E7	FDR. HPV16.E6sHPV16.E7	FC. HPV16.E6vs HPV16.E7	Regolazione
hsa-miR-34a	0	0	-7,37	down
hsa-miR-34a	0	0	-7,87	down
hsa-miR-34b*	3,34E-05	0,006	-3,86	down
hsa-miR-486-5p	0,0001	0,007	-2,86	down
hsa-miR-34c-5p	0,0001	0,009	-3,61	down
hsa-miR-424	0,0001	0,008	2,18	up
hsa-miR-34b*	0,0001	0,008	-4,69	down
hsa-miR-146a	0,0001	0,009	-2,57	down
hsa-miR-199a-3p	0,0003	0,011	3,20	up
hsa-miR-9	0,0004	0,014	-2,49	down
hsa-miR-199a-3p	0,0004	0,014	3,27	up
hsa-miR-34b	0,0005	0,014	-3,36	down
hsa-let-7a	0,0005	0,013	-1,83	down
hsa-miR-486-5p	0,0005	0,013	-3,47	down
hsa-miR-34c-5p	0,0006	0,014	-3,18	down
hsa-miR-486-3p	0,0007	0,015	-2,68	down
hsa-miR-369-3p	0,0008	0,017	1,85	up
hsa-let-7f	0,0010	0,019	-1,51	down
hsa-miR-15a	0,0011	0,019	-1,74	down
hsa-miR-100	0,0012	0,019	-2,48	down
hsa-miR-25	0,0012	0,019	-2,43	down
hsa-miR-22	0,0012	0,019	1,36	up
hsa-miR-199a-5p	0,0012	0,019	3,32	up
hsa-miR-22	0,0017	0,025	1,80	up
hsa-miR-126	0,0019	0,026	1,66	up
hsa-miR-455-5p	0,0025	0,031	-2,01	down
hsa-miR-34b	0,0026	0,030	-2,81	down
hsa-miR-15a*	0,0026	0,030	1,95	up
hsa-miR-371-5p	0,0029	0,032	-2,53	down
hsa-miR-181a	0,0041	0,039	-1,86	down
hsa-miR-15b	0,0041	0,039	-1,30	down

hsa-miR-146a	0,0045	0,041	-3,21	down
hsa-miR-16	0,0047	0,041	-2,19	down
hsa-miR-181c	0,0057	0,046	-2,65	down
hsa-miR-100*	0,0060	0,046	-2,29	down
hsa-miR-27a	0,0068	0,050	1,57	up
hsa-miR-454	0,0070	0,051	-2,09	down

FDR: false discovery rate; FC: fold change.

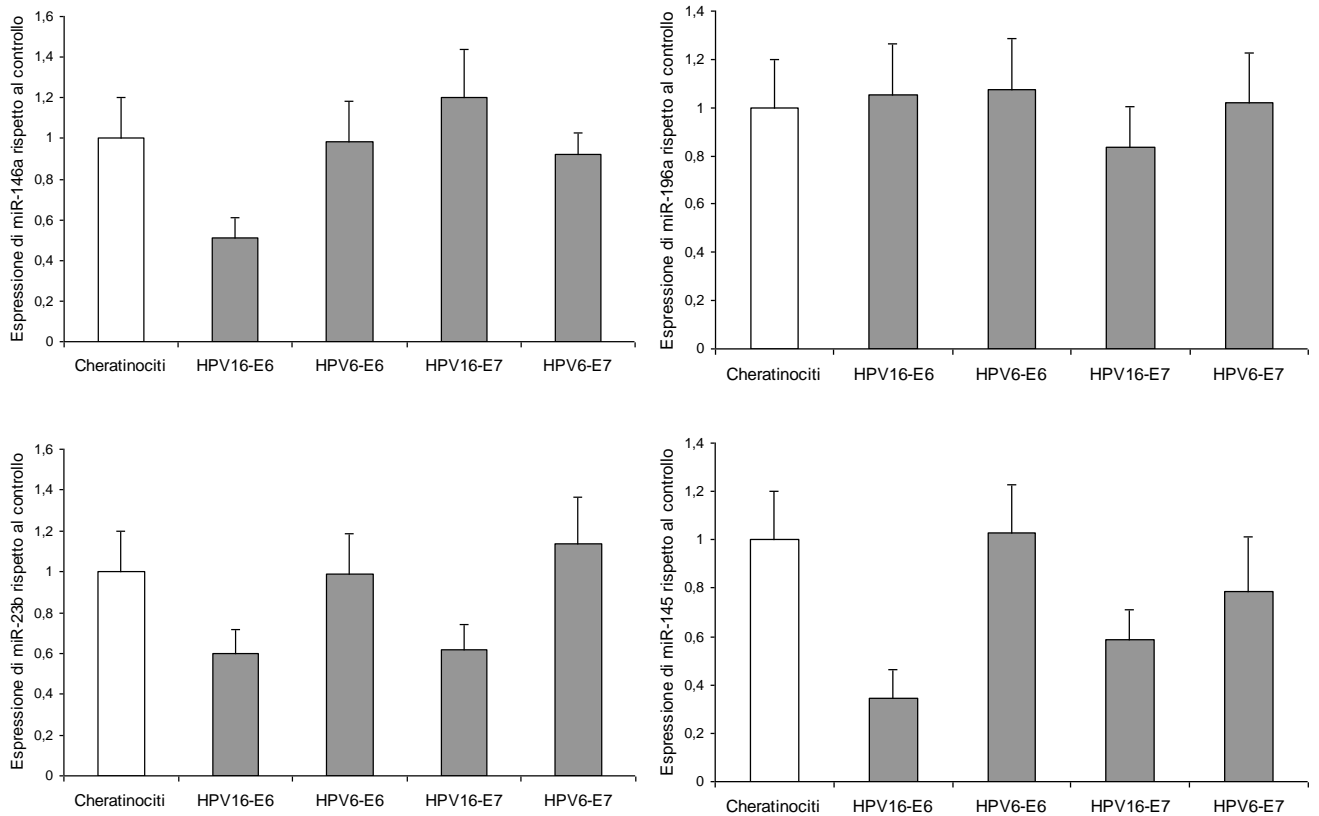


Fig. 13 Rappresentazione grafica dei risultati ottenuti con qRT-PCR relativi all'espressione dei miR-146a, miR-23b e miR-145 in cheratinociti umani esprimenti le oncoproteine E6 ed E7 di HPV16 e HPV6. I valori di espressione dei miRNA sono stati calcolati con metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ rispetto all'espressione nei cheratinociti, dopo normalizzazione rispetto al gene housekeeping RNU6.

2. E6 ed E7 di HPV16 alterano l'espressione dei miRNA anche in altri tipi di cellule: analisi in fibroblasti umani.

Colture primarie di fibroblasti umani ottenuti da prepuzio sono stati trasdotti con i vettori retrovirali LXSN16E6, LXSN16E7, LXSN6E6, LXSN6E7, LXSN. L'analisi del profilo di espressione dei microRNA cellulari è stata eseguita con microRNA microarray su campioni in quadruplicato (tabelle 12-15). Si segnala che la qualità dei dati dei microarray ottenuti con i fibroblasti è stata nettamente inferiore rispetto a quella dei dati ottenuti con i cheratinociti, verosimilmente dovuta alla difficoltà di trasduzione dei fibroblasti e alla senescenza dei fibroblasti analizzati. Comunque, anche nei fibroblasti i geni *E6* ed *E7* di HPV6, a differenza di *E6* ed *E7* di HPV16, non hanno alterato significativamente l'espressione di alcun microRNA. I microRNA la cui espressione variava significativamente nei fibroblasti positivi per HPV16-E6 rispetto a quelli HPV6-E6-positivi sono riportati in tabella 12. Alcune alterazioni dell'espressione dei microRNA erano simili a quelle osservate nei cheratinociti, come la riduzione dell'espressione del miR-34a, miR-1915 e let-7c e l'induzione dell'espressione dei miR-424 e miR-199a-3p. I cambiamenti di espressione dei miR146a e let-7c erano significativi anche all'analisi multivariata, considerando i fibroblasti positivi per HPV16 E6, per HPV6 E6 e i fibroblasti di controllo trasdotti con il vettore vuoto LXSN. Il miR-146a è risultato up-regolato, e non down-regolato, nei fibroblasti HPV16-E6-positivi. Inoltre, sono risultati up-regolati i miR-29b, miR-424, miR-196a, miR-218, ecc.

Tabella 12. Risultati dell'analisi statistica dei microarray. Confronto di fibroblasti HPV16-E6-positivi vs. fibroblasti HPV6-E6-positivi.

miRNA	pval.SAM HPV16E6vs. HPV6E6	FDR.SAM. HPV16E6vs. HPV6E6	FC.HPV16E6vs HPV6E6	Regolazione
hsa-miR-34a	0	0	6,04	down
hsa-miR-29b	0	0	2,01	up
hsa-miR-146a	0	0	7,01	up
hsa-miR-424	0	0	2,57	up
hsa-miR-196a	0	0	1,60	up
hsa-miR-199a-3p	0	0	1,66	up
hsa-miR-1274b	0	0	-2,39	down
hsa-miR-218	4,13E-05	0,005	1,89	up
hsa-miR-21	4,13E-05	0,005	4,47	up
hsa-miR-19b	4,13E-05	0,005	1,46	up
hsa-miR-494	4,13E-05	0,005	-2,17	down
hsa-miR-27a	1,24E-04	0,015	1,62	up
hsa-miR-26b	2,07E-04	0,017	1,51	up
hsa-miR-138	2,07E-04	0,017	1,45	up
hsa-miR-140-3p	2,07E-04	0,017	1,45	up
hsa-miR-376c	2,07E-04	0,017	1,35	up
hsa-miR-892b	2,07E-04	0,017	-1,63	down
hsa-miR-1915	2,07E-04	0,017	-1,44	down
hsa-let-7c	3,72E-04	0,026	-1,65	down
hsa-miR-376a	3,72E-04	0,026	1,46	up
hsa-miR-214	3,72E-04	0,026	-1,54	down
hsa-miR-222	3,72E-04	0,026	1,63	up
hsa-miR-137	4,55E-04	0,028	1,41	up
hsa-miR-199a-3p	4,55E-04	0,028	1,58	up
hsa-miR-376c	4,55E-04	0,028	1,31	up

L'espressione di E7 di HPV16 era associata ad una significativa induzione dell'espressione del miR-146a e ad una riduzione dell'espressione dei miR-145, miR-23b e let-7c (Tabella 13).

Tabella 13. Risultati dell'analisi statistica dei microarray. Confronto di fibroblasti HPV16-E7-positivi vs. fibroblasti HPV6-E7-positivi.

miRNA	mean.HPV6-E7	mean.HPV16-E7	P value (FDR 5%)	FC.HPV16vs6
<i>Upregulated miRNAs</i>				
miR-146a	5,45	8,02	0,00	4,15
<i>Downregulated miRNAs</i>				
let-7c	8,57	8,07	0,05	-1,42
miR-23b	7,58	6,57	0,05	-2,39
miR-145	6,70	5,57	0,04	-3,29

Il confronto diretto dei fibroblasti HPV16-E6-positivi con quelli HPV16-E7-positivi ha dimostrato che E7 era associata con la riduzione dell'espressione dei alcuni microRNA, tra cui quelli della famiglia let-7, e i miR-23b, miR-196a, miR-143 e miR-145, mentre l'espressione di E6 era associata alla riduzione dell'espressione del miR-34a (Tabella 14).

Tabella 14. miRNA significativamente alterati da E6 ed E7 di HPV16 vs. HPV6 (analisi ANOVA).

miRNA	fdr. HPV6 vs HPV16 (p*)	Fold change HPV6 vs HPV16	fdr. E6 vs E7 (p*)	Fold change vs E7 (p*)	Fold change HPV16 E6 vs E6E7 (p*)	Fold change HPV16 E7 vs E6E7 (p*)
miR-196a	0,0220	-1.15	0,0009	1.59 (0.024)	1.69 (0.015)	1,06
miR-146a	0,0001	-3.63	0,0009	1,26	2,9	2,3
miR-145	0,0135	1.27	0,0140	-1,08	-1.64 (<0.001)	-1,52
miR-34a	0,7188	1.26	0,0072	-1.7 (0.017)	2.15 (0.026)	3.65 (0.001)
miR-23b	0,0140	1.53	0,0801	1,28	-1,21	-1,54
let-7c	0,0078	1.38	0,2407	-1,08	-1,14	-1,05

3. Profilo di espressione dei microRNA nelle linee cellulari di carcinoma della cervice uterina.

L'analisi del profilo di espressione dei microRNA tramite miRNA microarray è stata effettuata anche nelle linee cellulari di carcinoma della cervice uterina (CaSki, SiHa, HeLa e C33A). Le linee tumorali CaSki e SiHa sono positive per HPV16, la linea cellulare HeLa è HPV18-positiva, mentre la linea tumorale C33A è negativa per HPV e ha il gene *TP53*-mutato. Nella tabella 16 sono elencati i miRNA la cui espressione è risultata significativamente alterata nelle linee cellulari HPV-positive rispetto ai cheratinociti normali. Si segnala la netta riduzione dell'espressione del miR-146a nelle linee tumorali HPV-positive.

Tabella 16. MiRNA i cui livelli di espressione sono significativamente diversi nelle linee di carcinoma della cervice uterina HPV-positive (CaSki, SiHa e HeLa) rispetto ai cheratinociti normali.

	Fold change HPV-pos vs. cheratinociti	Regolazione
hsa-miR-501-5p	46.33	up
hsa-miR-182	21.63	up
hsa-miR-363	8.85	up
hsa-miR-135a	4.12	up
hsa-miR-145	5.28	down
hsa-miR-154	11.17	down
hsa-miR-199a-3p	45.10	down
hsa-miR-199a-5p	20.09	down
<u>hsa-miR-146a</u>	<u>154.79</u>	down
hsa-miR-376a*	10.05	down
hsa-miR-376a	172.78	down
hsa-miR-376c	186.9	down

Il confronto sui dati ottenuti dai microarray sul profilo di espressione dei microRNA nella linea C33A ha dimostrato una significativa riduzione dell'espressione del miR-146a rispetto ai cheratinociti normali (tabella 17), come osservato anche nelle due linee tumorali HPV-positive (tabella 16). I miR-183, miR182, miR-99a, miR-192 erano significativamente sovraespressi nella

linea tumorale C33A rispetto ai cheratinociti normali. Tra i microRNA sovraespressi il miR-182 risulta sovraespresso anche dalle linee tumorali HPV-positive (tabella 16). I microRNA della famiglia 34 (miR-34a e miR-34c-5p) e il miR-23b sono significativamente sottoespressi in accordo con i dati della letteratura sul fatto che questi miRNA sono target di p53.

Tabella 17. MiRNA i cui livelli di espressione sono significativamente diversi nella linea di carcinoma della cervice uterina HPV-negativa e TP53-mutata, C33A, rispetto ai cheratinociti umani normali.

miRNA	Fold change C33A vs. cheratinociti	Regolazione
hsa-miR-96	55,91	up
hsa-miR-183	51,63	up
hsa-miR-182	21,7	up
hsa-miR-99a	13,28	up
hsa-miR-192	10,05	up
hsa-let-7c	5,48	up
hsa-let-7e	3,38	down
hsa-let-7d	7,81	down
hsa-miR-23a	7,92	down
hsa-miR-23b*	11,46	down
hsa-miR-23b	17,33	down
hsa-miR-34c-5p	19	down
hsa-miR-199b-5p	20,67	down
hsa-miR-22	25	down
hsa-miR-155	30,31	down
hsa-miR-154	40,83	down
hsa-miR-34a	140,58	down
<u>hsa-miR-146a</u>	<u>319,2</u>	down
hsa-miR-376a	356,31	down

L'espressione di alcuni miRNA è stata valutata nei fibroblasti trasfettati anche mediante qRT-PCR, che ha confermato i risultati ottenuti con miRNA microarray. Nella figura 14 sono riportati i valori medi di espressione del miR-146a misurati con qRT-PCR.

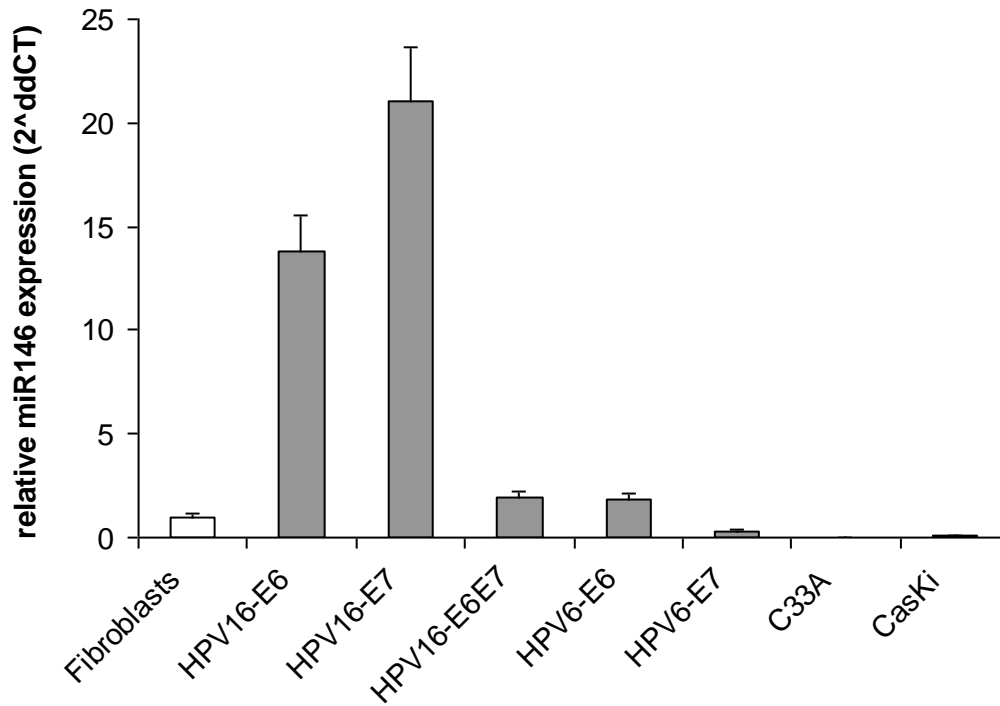


Fig.14 Rappresentazione grafica dei risultati ottenuti con qRT-PCR relativi all'espressione dei miR-146a, miR-23b e miR-145 in fibroblasti umani esprimenti le oncoproteine E6 ed E7 di HPV16 e HPV6. I valori di espressione dei miRNA sono stati calcolati con metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ rispetto all'espressione nei fibroblasti, dopo normalizzazione rispetto al gene *housekeeping* RNU6.

4. Analisi del profilo di espressione dei microRNA in campioni citologici cervicali.

L'analisi con microarray nelle colture primarie di cheratinociti e di fibroblasti ottenuti da prepuzio ha portato alla selezione di un gruppo di microRNA significativamente modulati da E6 e/o E7 di HPV16. Questi miRNA sono stati analizzati mediante real-time qRT-PCR in campioni citologici cervicali e in una casistica di tessuti fissati in formalina e paraffinati di condilomi, carcinomi squamosi in situ e carcinomi squamosi invasivi del pene. La scelta dei microRNA da analizzare nei campioni clinici è stata guidata anche dalla revisione della letteratura sui miRNA associati ad infezione da HPV e a carcinoma invasivo del collo dell'utero.

La casistica di campioni citologici cervicali comprendeva 40 campioni, di cui 10 positivi per HPV16, 10 positivi per HR-HPV diversi da HPV16, 10 positivi per LR-HPV e 10 HPV negativi. I campioni erano stati selezionati in modo da avere solamente alterazioni citologiche di basso grado o citologia normale. I miRNA analizzati sono riportati nelle tabelle 18 e 19, nelle quali sono anche evidenziati i miRNA la cui espressione variava in modo significativo a seconda della presenza o meno di HR-HPV. I dati di espressione di questi miRNA sono illustrati nelle figure 15-18. I valori di espressione dei miRNA sono stati calcolati anche col metodo $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizzando come riferimento la media dei valori di ΔCT di tutti i campioni e come *housekeeping* RNU6.

Tabella 18. Associazione tra livelli di espressione dei miRNA in 40 campioni citologici cervicali e presenza o assenza di HR-HPV. L'analisi dell'espressione dei miRNA è stata effettuata mediante qRT-PCR.

Riepilogo test dell'ipotesi				
	Ipotesi nulla	Test	Sign.	Decisione
1	La distribuzione di miR218 è la stessa sulle categorie di HRHPV.	Test U di Mann-Whitney a campioni indipendenti	,036	Rifiuta l'ipotesi nulla.
2	La distribuzione di miR126 è la stessa sulle categorie di HRHPV.	Test U di Mann-Whitney a campioni indipendenti	,766	Mantieni l'ipotesi nulla.
3	La distribuzione di miR34c è la stessa sulle categorie di HRHPV.	Test U di Mann-Whitney a campioni indipendenti	,088	Mantieni l'ipotesi nulla.
4	La distribuzione di miR368 è la stessa sulle categorie di HRHPV.	Test U di Mann-Whitney a campioni indipendenti	1,000	Mantieni l'ipotesi nulla.
5	La distribuzione di miR34b è la stessa sulle categorie di HRHPV.	Test U di Mann-Whitney a campioni indipendenti	,016	Rifiuta l'ipotesi nulla.
6	La distribuzione di let7c è la stessa sulle categorie di HRHPV.	Test U di Mann-Whitney a campioni indipendenti	,006	Rifiuta l'ipotesi nulla.
7	La distribuzione di miR210 è la stessa sulle categorie di HRHPV.	Test U di Mann-Whitney a campioni indipendenti	,003	Rifiuta l'ipotesi nulla.
8	La distribuzione di let7a è la stessa sulle categorie di HRHPV.	Test U di Mann-Whitney a campioni indipendenti	,003	Rifiuta l'ipotesi nulla.
9	La distribuzione di miR21 è la stessa sulle categorie di HRHPV.	Test U di Mann-Whitney a campioni indipendenti	,372	Mantieni l'ipotesi nulla.
10	La distribuzione di miR182 è la stessa sulle categorie di HRHPV.	Test U di Mann-Whitney a campioni indipendenti	,330	Mantieni l'ipotesi nulla.
11	La distribuzione di miR133a è la stessa sulle categorie di HRHPV.	Test U di Mann-Whitney a campioni indipendenti	,372	Mantieni l'ipotesi nulla.
12	La distribuzione di miR143 è la stessa sulle categorie di HRHPV.	Test U di Mann-Whitney a campioni indipendenti	,267	Mantieni l'ipotesi nulla.
13	La distribuzione di let7b è la stessa sulle categorie di HRHPV.	Test U di Mann-Whitney a campioni indipendenti	,156	Mantieni l'ipotesi nulla.
14	La distribuzione di miR1 è la stessa sulle categorie di HRHPV.	Test U di Mann-Whitney a campioni indipendenti	,267	Mantieni l'ipotesi nulla.
15	La distribuzione di miR34a è la stessa sulle categorie di HRHPV.	Test U di Mann-Whitney a campioni indipendenti	,001	Rifiuta l'ipotesi nulla.
16	La distribuzione di miR183 è la stessa sulle categorie di HRHPV.	Test U di Mann-Whitney a campioni indipendenti	,685	Mantieni l'ipotesi nulla.
17	La distribuzione di miR451 è la stessa sulle categorie di HRHPV.	Test U di Mann-Whitney a campioni indipendenti	,516	Mantieni l'ipotesi nulla.

Le significatività asintotiche sono visualizzate. Il livello di significatività è ,05.

I microRNA miR-218, miR-34a, miR-34b, let-7a, let-7c e miR-210 sono risultati significativamente meno espressi nei campioni HR-HPV-positivi rispetto a quelli HR-HPV-negativi (Fig.15A/B) e ai campioni LR-HPV-positivi e HPV-negativi (Fig. 16).

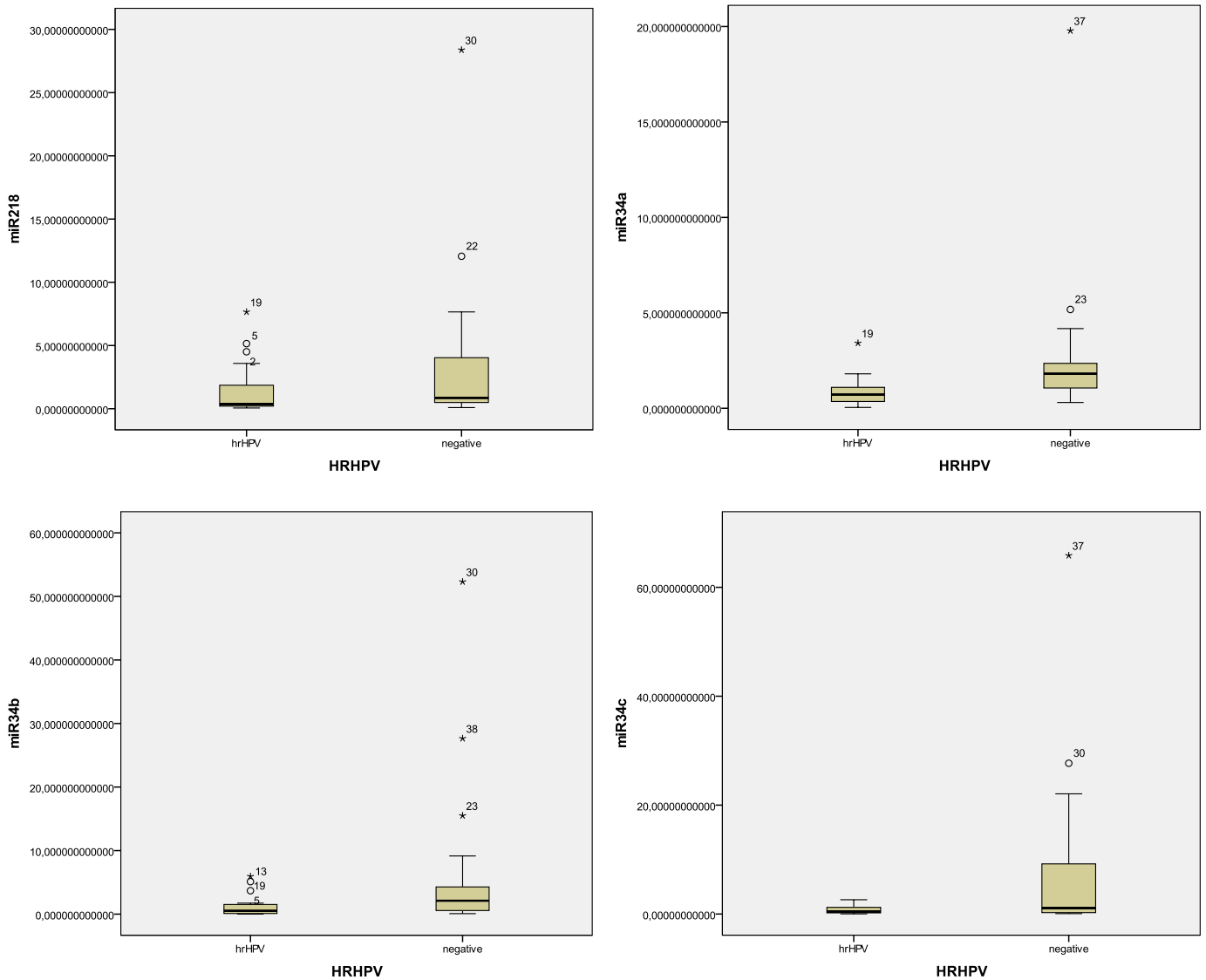


Fig.15 A. Rappresentazione grafica dei miRNA la cui espressione è risultata significativamente ridotta nei campioni citologici cervicali HR-HPV-positivi rispetto a quelli HR-HPV-negativi (test U di Mann Whitney, $P>0,05$).

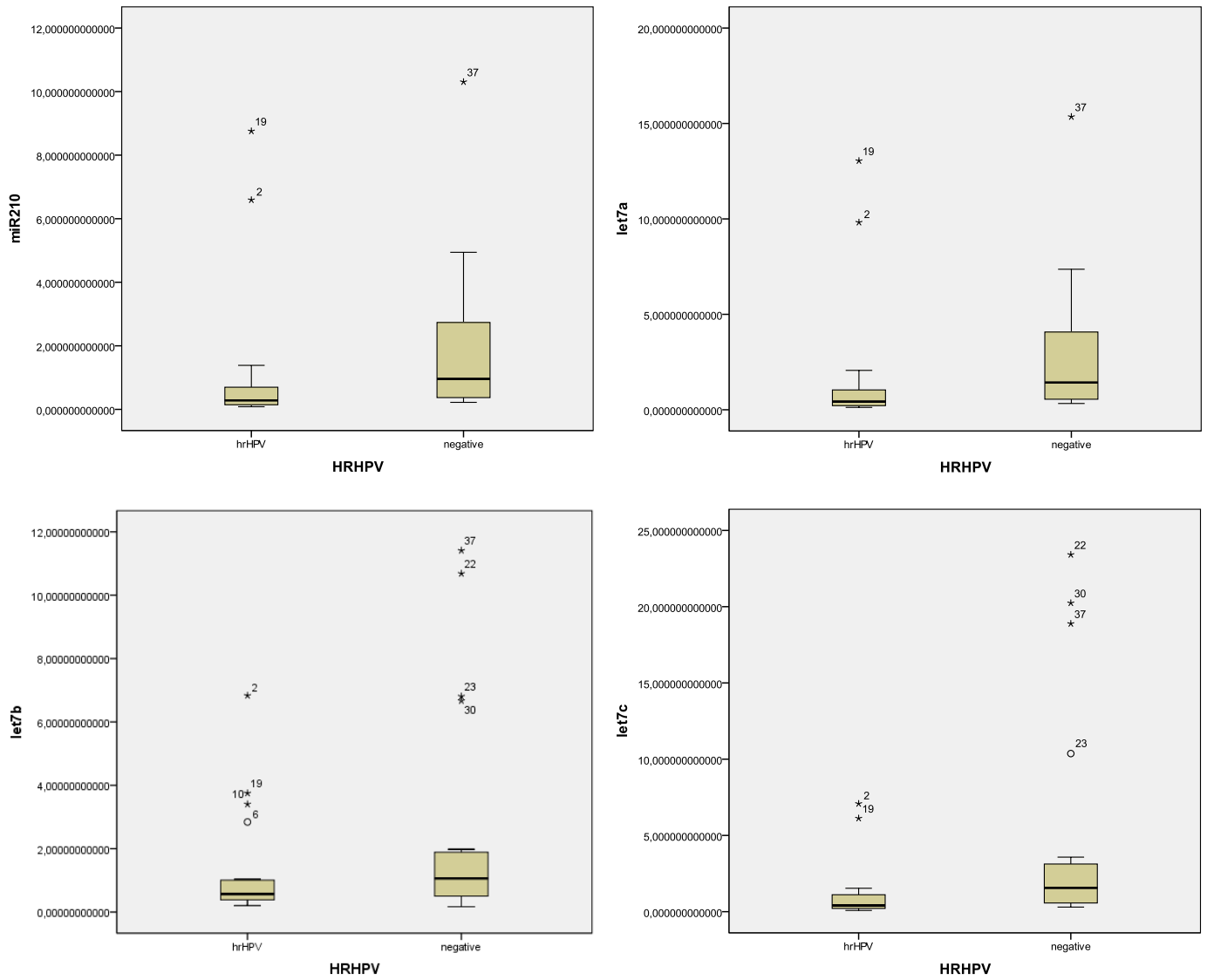


Fig.15 B. Rappresentazione grafica dei miRNA la cui espressione è risultata significativamente ridotta nei campioni citologici cervicali HR-HPV-positivi rispetto a quelli HR-HPV-negativi (test U di Mann Whitney, $P > 0,05$).

Tabella 19. Associazione tra livelli di espressione dei miRNA in 40 campioni citologici cervicali e presenza di HR-HPV, LR-HPV, e assenza di HPV. L'analisi dell'espressione dei miRNA è stata effettuata mediante qRT-PCR.

Riepilogo test dell'ipotesi				
	Ipotesi nulla	Test	Sign.	Decisione
1	La distribuzione di miR218 è la stessa sulle categorie di HPVtype.	Test di Kruskal-Wallis a campioni indipendenti	,100	Mantieni l'ipotesi nulla.
2	La distribuzione di miR126 è la stessa sulle categorie di HPVtype.	Test di Kruskal-Wallis a campioni indipendenti	,868	Mantieni l'ipotesi nulla.
3	La distribuzione di miR34c è la stessa sulle categorie di HPVtype.	Test di Kruskal-Wallis a campioni indipendenti	,234	Mantieni l'ipotesi nulla.
4	La distribuzione di miR368 è la stessa sulle categorie di HPVtype.	Test di Kruskal-Wallis a campioni indipendenti	,408	Mantieni l'ipotesi nulla.
5	La distribuzione di miR34b è la stessa sulle categorie di HPVtype.	Test di Kruskal-Wallis a campioni indipendenti	,048	Rifiuta l'ipotesi nulla.
6	La distribuzione di let7c è la stessa sulle categorie di HPVtype.	Test di Kruskal-Wallis a campioni indipendenti	,018	Rifiuta l'ipotesi nulla.
7	La distribuzione di miR210 è la stessa sulle categorie di HPVtype.	Test di Kruskal-Wallis a campioni indipendenti	,011	Rifiuta l'ipotesi nulla.
8	La distribuzione di let7a è la stessa sulle categorie di HPVtype.	Test di Kruskal-Wallis a campioni indipendenti	,011	Rifiuta l'ipotesi nulla.
9	La distribuzione di miR21 è la stessa sulle categorie di HPVtype.	Test di Kruskal-Wallis a campioni indipendenti	,637	Mantieni l'ipotesi nulla.
10	La distribuzione di miR182 è la stessa sulle categorie di HPVtype.	Test di Kruskal-Wallis a campioni indipendenti	,451	Mantieni l'ipotesi nulla.
11	La distribuzione di miR133a è la stessa sulle categorie di HPVtype.	Test di Kruskal-Wallis a campioni indipendenti	,550	Mantieni l'ipotesi nulla.
12	La distribuzione di miR143 è la stessa sulle categorie di HPVtype.	Test di Kruskal-Wallis a campioni indipendenti	,482	Mantieni l'ipotesi nulla.
13	La distribuzione di let7b è la stessa sulle categorie di HPVtype.	Test di Kruskal-Wallis a campioni indipendenti	,364	Mantieni l'ipotesi nulla.
14	La distribuzione di miR1 è la stessa sulle categorie di HPVtype.	Test di Kruskal-Wallis a campioni indipendenti	,453	Mantieni l'ipotesi nulla.
15	La distribuzione di miR34a è la stessa sulle categorie di HPVtype.	Test di Kruskal-Wallis a campioni indipendenti	,005	Rifiuta l'ipotesi nulla.
16	La distribuzione di miR183 è la stessa sulle categorie di HPVtype.	Test di Kruskal-Wallis a campioni indipendenti	,636	Mantieni l'ipotesi nulla.
17	La distribuzione di miR451 è la stessa sulle categorie di HPVtype.	Test di Kruskal-Wallis a campioni indipendenti	,781	Mantieni l'ipotesi nulla.

Le significatività asintotiche sono visualizzate. Il livello di significatività è ,05.

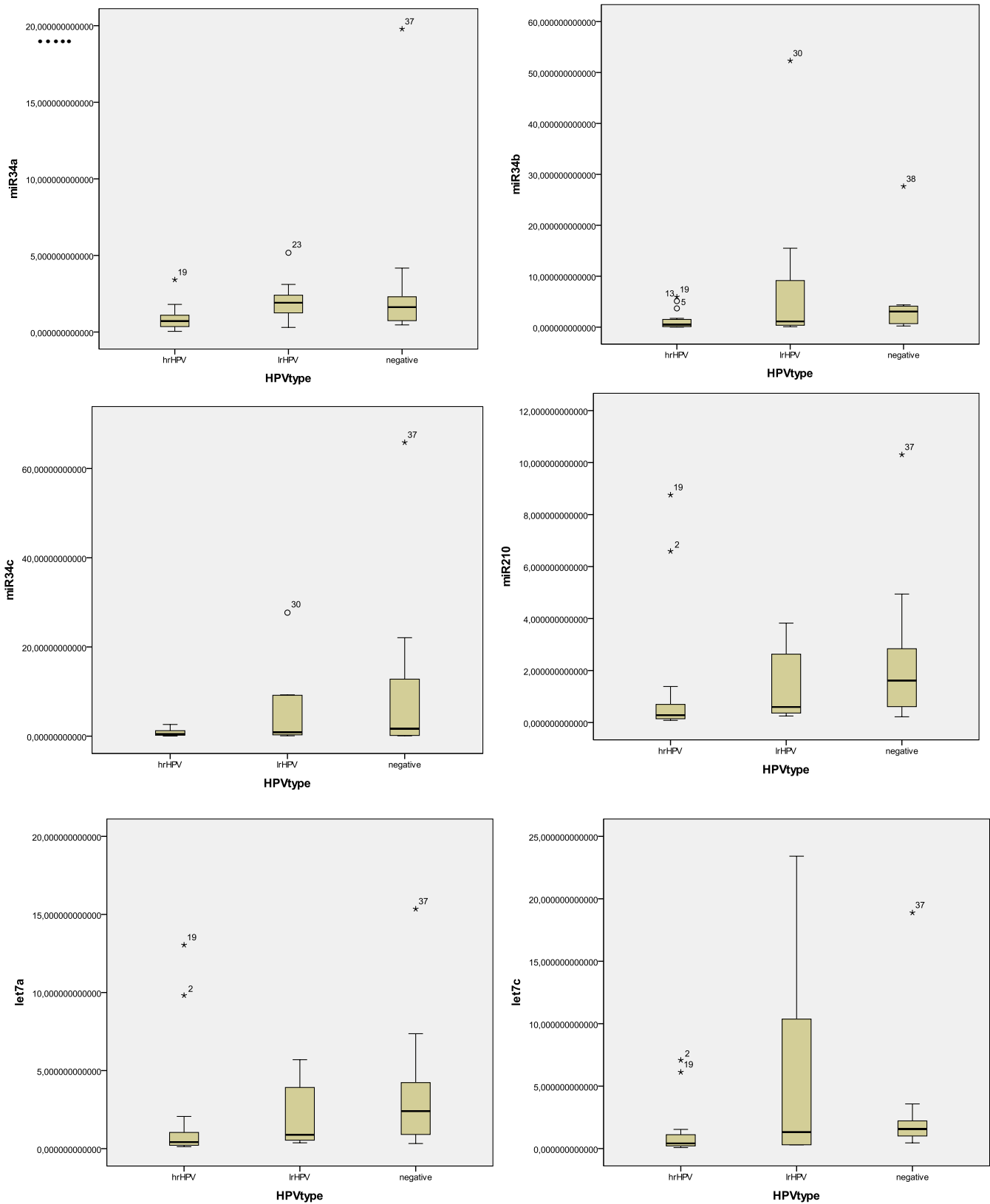


Fig.16 Rappresentazione grafica dei miRNA la cui espressione è risultata significativamente ridotta nei campioni citologici cervicali HR-HPV-positivi rispetto ai campioni LR-HPV-positivi e HPV-negativi (test U di Mann Whitney, $P > 0,05$).

L'espressione del miR-146a non cambiava tra campioni citologici cervicali positivi per HR-HPV DNA (n=15) vs campioni negativi per HR-HPV DNA (n=15) (Fig. 17).

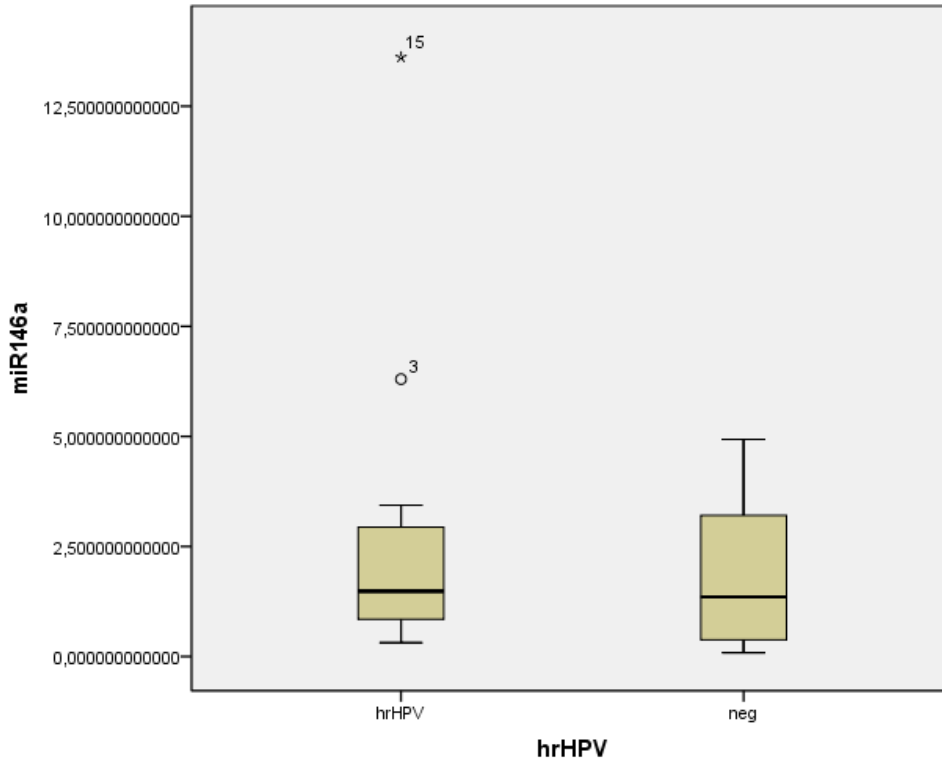
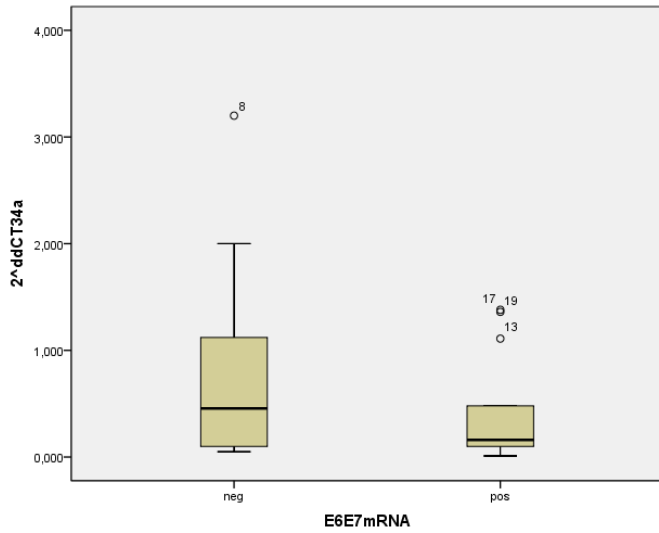


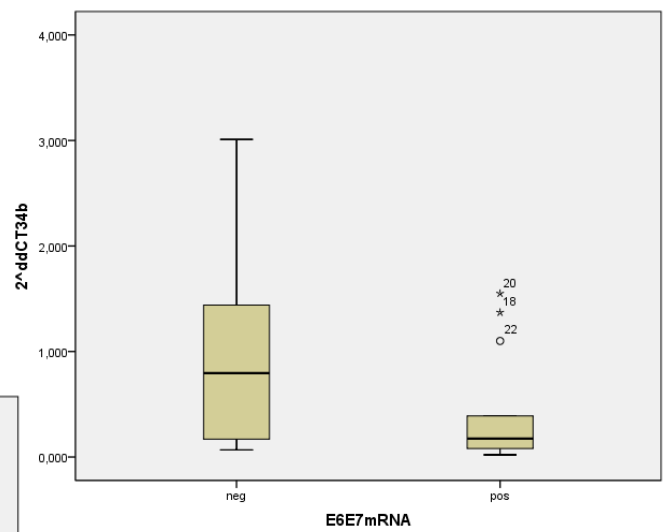
Fig.17 Livelli di miR-146a in campioni citologici cervicali HR-HPV DNA-positivi e HR-HPV DNA-negativi.

L'espressione di microRNA della famiglia miR-34 è stata analizzata in un gruppo di 20 campioni citologici positivi per HPV DNA, dei quali 10 erano positivi per E6/E7 mRNA degli HR-HPV di tipo 16, 18, 31, 33, 45. I risultati sono riportati nella figura 18, che dimostra una riduzione, anche se non significativa dell'espressione dei miR-34a e miR-34b e un aumento del miR-34c nei campioni positivi per E6/E7 mRNA.

miR-34a



miR-34b



miR-34c

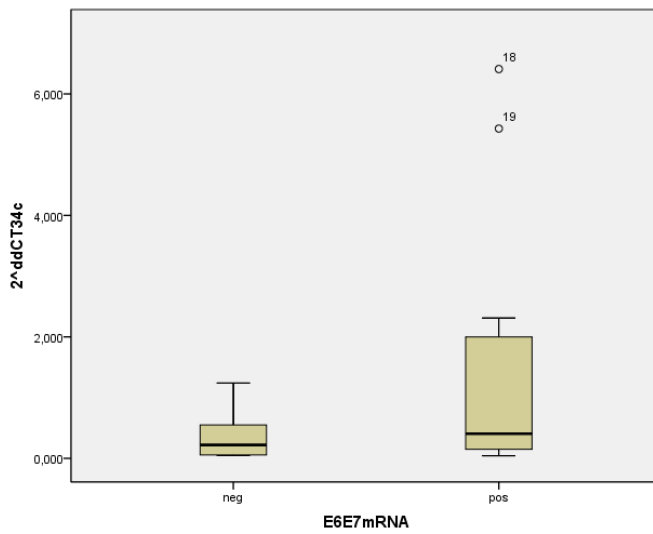


Fig. 18 Livelli di espressione di miR-34a, miR-34b, miR-34c in campioni citologici cervicali in relazione all'espressione di HR-HPV E6/E7 mRNA analizzato con test NucliSens EasyQ (bioMerieux).

5. Analisi dell'espressione dei microRNA in carcinomi e condilomi del pene.

L'espressione dei microRNA maturi miR-145, miR-146a, miR-23b, miR-218, miR-196a, hsa-miR-34a, e hsa-let-7c è stata analizzata mediante real-time qRT-PCR su una casistica di carcinomi e condilomi del pene.

La casistica comprendeva 54 carcinomi squamosi invasive del pene, 5 carcinomi squamosi *in situ* del pene e 8 condilomi del pene. Sequenze di HPV DNA sono state rilevate in 2/5 (40%) carcinomi in situ (1 caso con HPV16 e 1 con HPV11) e in 16/54 (30%) carcinomi invasivi (14 HPV16-positivi, 1 HPV45-positivo, 1 HPV68-positivo). Tutti gli 8 condilomi erano HPV-positivi (6 HPV6-positivi, 1 HPV6 e HPV31-positivo, 1 HPV11-positivo). La misurazione del numero di copie genomiche di HPV DNA mediante real-time qPCR ha dimostrato la presenza di circa 1-100 copie genomiche/cellula, compatibile con una espansione clonale di cellule tumorali HPV-positive.

In tutti i casi è stata analizzata l'espressione di p16INKa e p53 mediante immunocistochimica e i risultati di espressione dei miRNA sono stati correlati con l'espressione di queste proteine. Nelle figure 20-21 sono illustrati alcuni esempi di espressione di p53 e p16 nei campioni studiati mentre nella figura 19 sono riportati immagini dei tessuti tumorali colorati con ematossilina/eosina.

Dieci carcinomi invasivi, 9 dei quali HPV16-positivi, sono risultati p16-positivi e p53-negativi; 8 carcinomi invasivi e 1 carcinoma in situ sono risultati p16-positivi e p53-positivi, 6 dei quali erano positivi per HR-HPV e 3 HPV-negativi; 22 carcinomi invasivi, 1 carcinoma in situ e tre condilomi (dei quali i condilomi erano positivi per HPV6 o HPV11 e i carcinomi tutti HPV-negativi) erano p53-positivi e p16-negativi; infine 14 carcinomi squamosi invasivi (di cui 1 HPV16-positivo), 4 carcinomi in situ (di cui 1 HPV11-positivo) e 5 condilomi (tutti positivi per HPV6 o HPV11) erano negativi sia per p63 sia per p16.

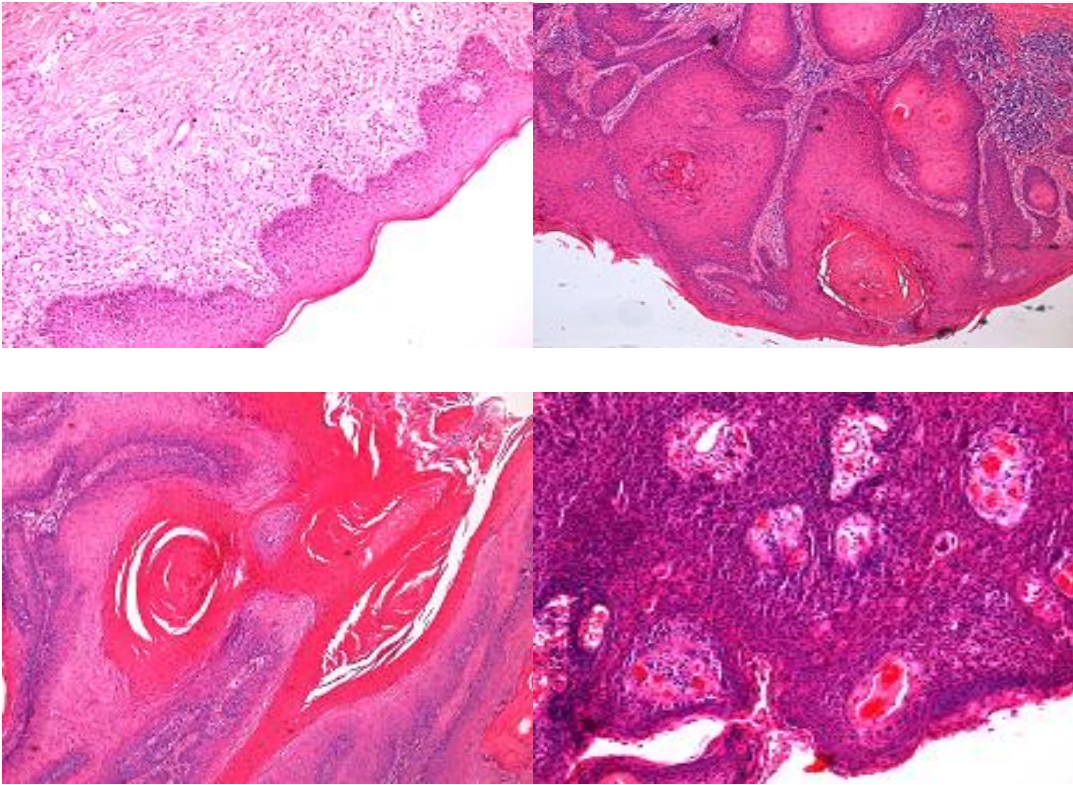


Fig.19 Immagini istologiche di tessuti del carcinoma squamocellulare del pene, colorati con ematossilina/eosina.

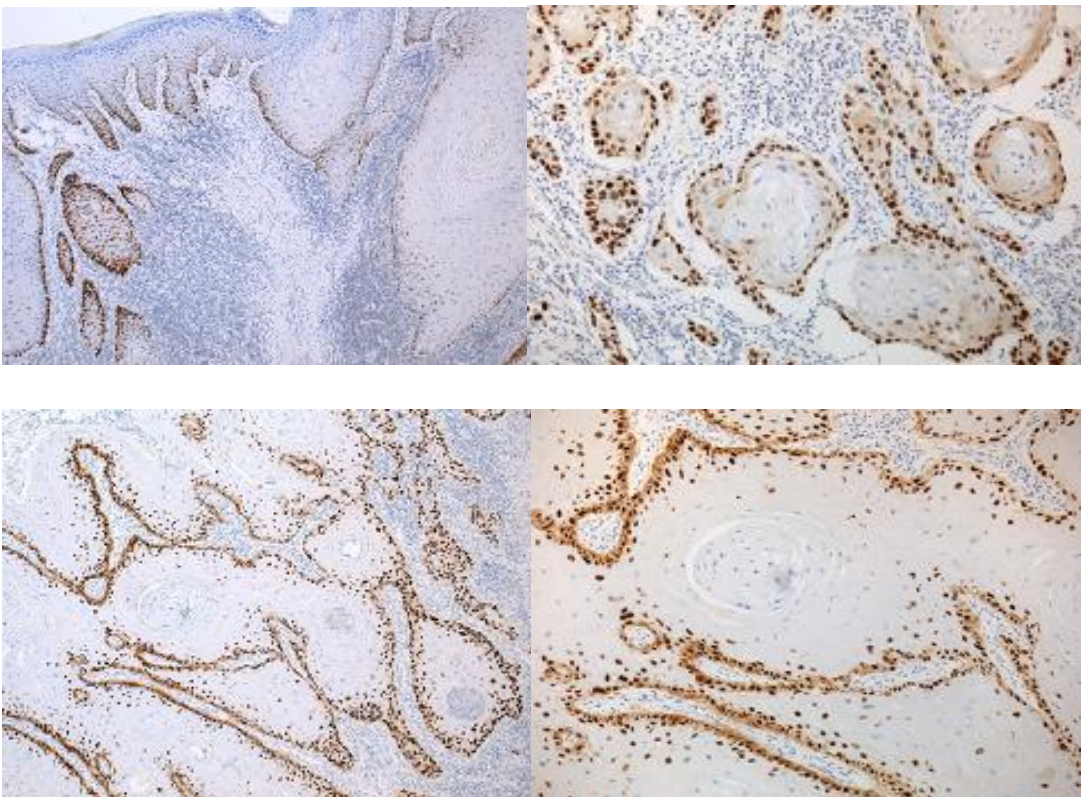


Fig.20 Immagini di tessuti di carcinoma invasivo del pene colorati mediante immunohistochimica per il p53.

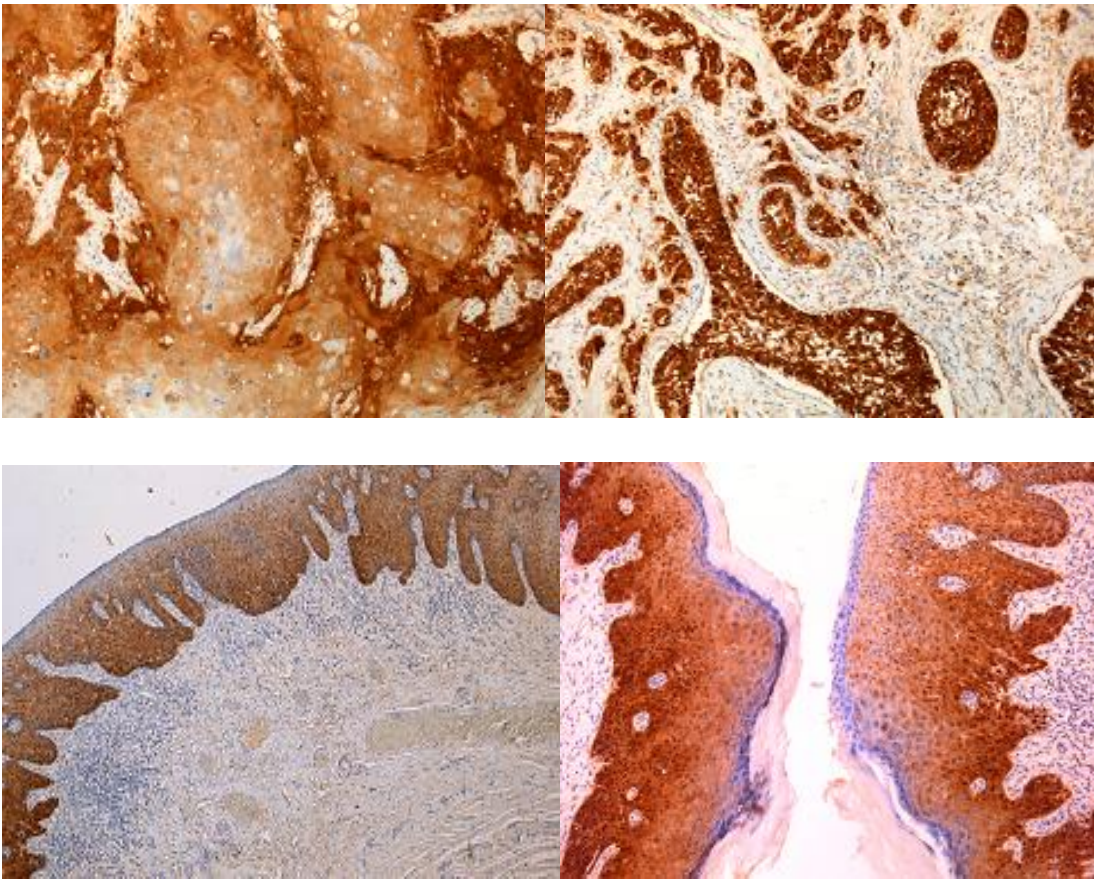


Fig.21 Immagini di tessuti di carcinoma invasivo del pene colorate mediante immunocistochimica su per p16INK4.

L'analisi dell'espressione dei microRNA ha dimostrato una significativa associazione tra espressione del miR-34a e diagnosi istologica di carcinoma vs. condiloma, essendo risultati i livelli del miR-34a maggiori nei carcinomi ($P < 0,05$, test U di Mann-Whitney) (Fig.22).

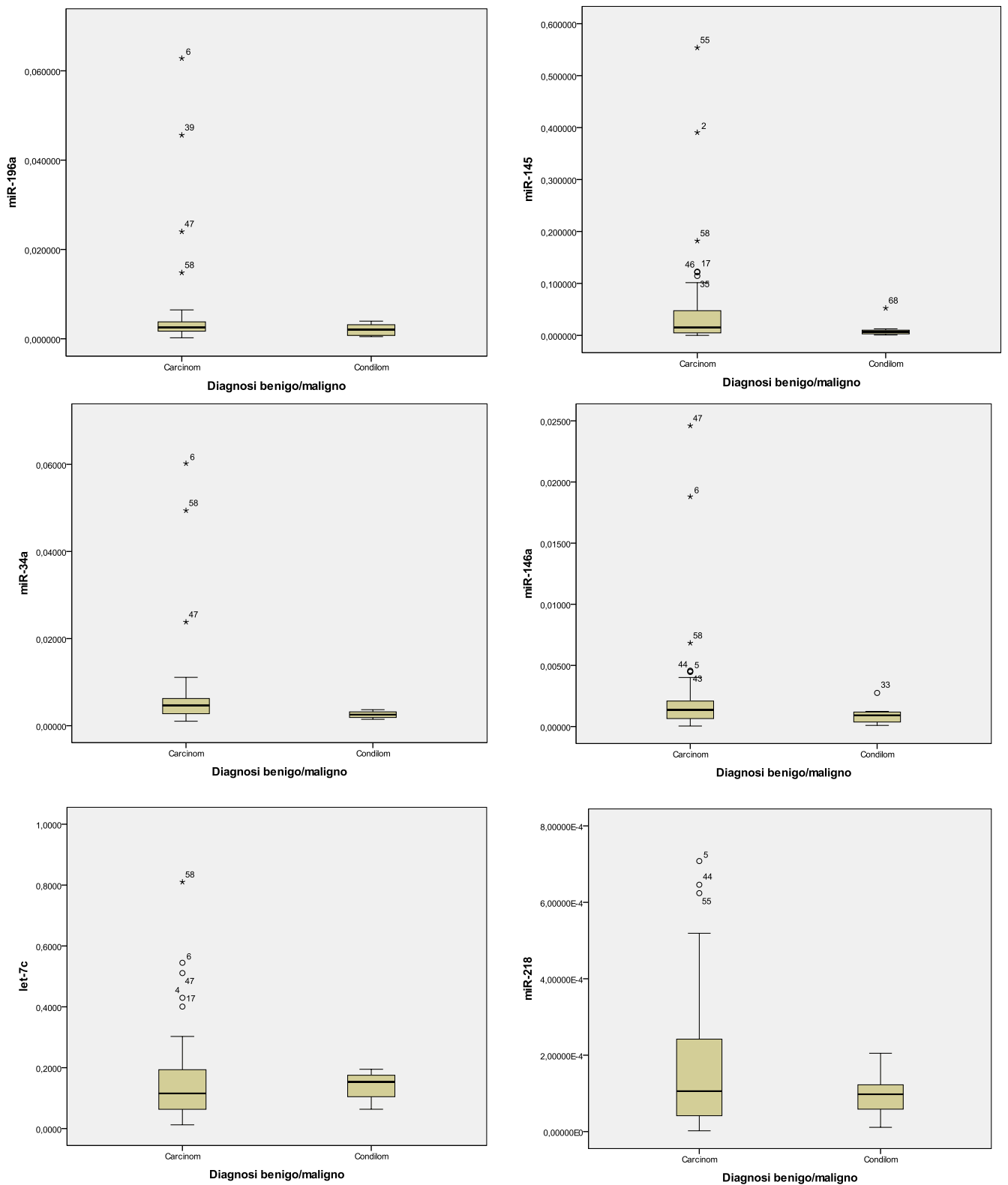


Fig.22 Livelli di miRNA in carcinomi vs. condilomi del pene, misurati con qRT-PCR.

E' stato inoltre dimostrato un significativo aumento dell'espressione del miR-218 nei tessuti p53-positivi ($P < 0,05$, test U di Mann-Whitney), mentre non è stata dimostrata alcuna associazione tra espressione di p53 e gli altri miRNA studiati (Fig.23).

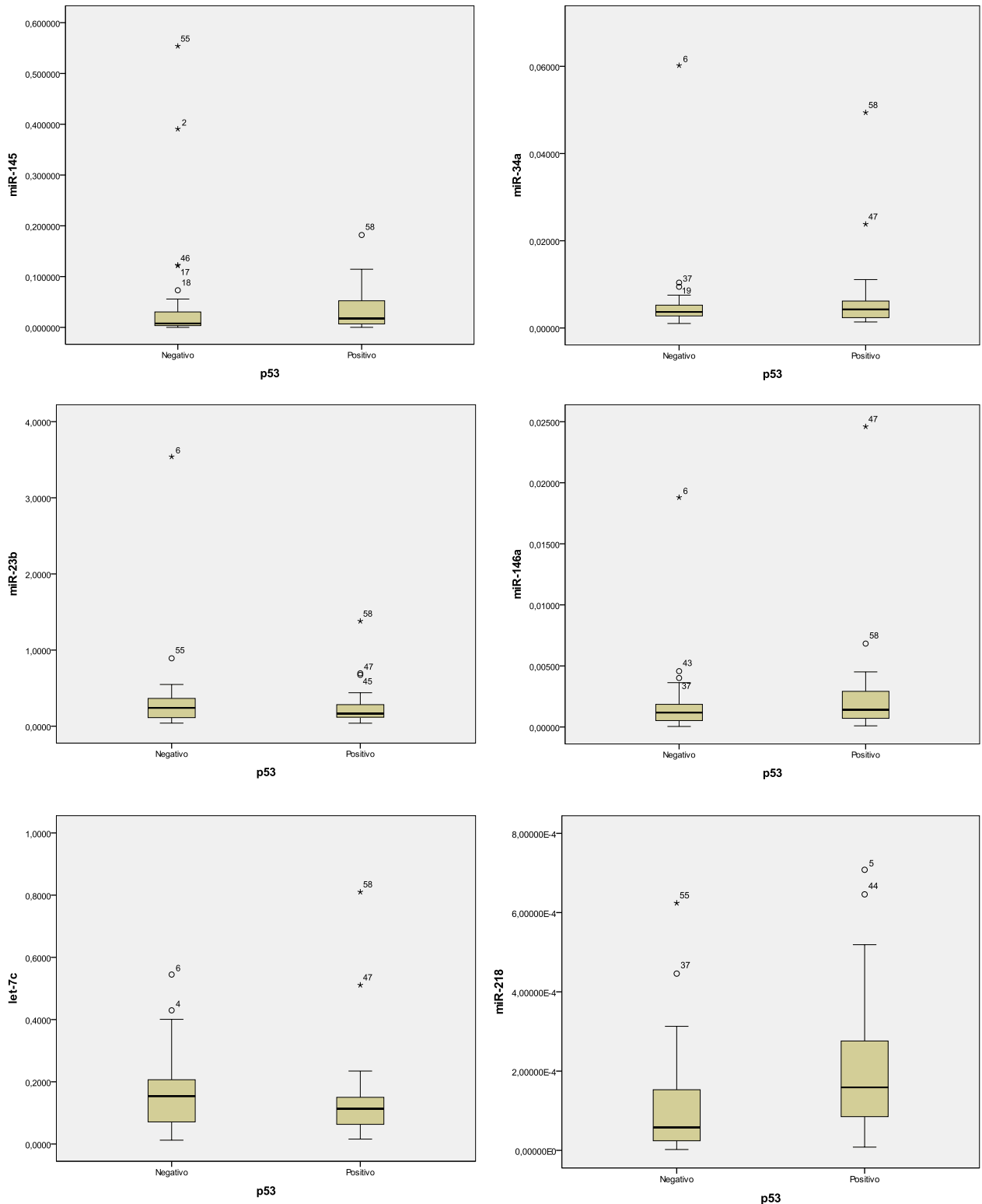


Fig.23 Livelli di miRNA in lesioni del pene p53-positive vs. lesioni p53-negative.

Nessuna associazione significativa è stata dimostrata tra espressione dei microRNA ed espressione di p16, sia considerando il solo pattern 3 che tutti i pattern di espressione di p16, anche se i livelli di miR-146a tendevano ad essere inferiori nei campioni p16-negativi (Fig.24). Anche i pattern di espressione di p53 in combinazione con p16 non erano associati all'espressione dei miRNA.

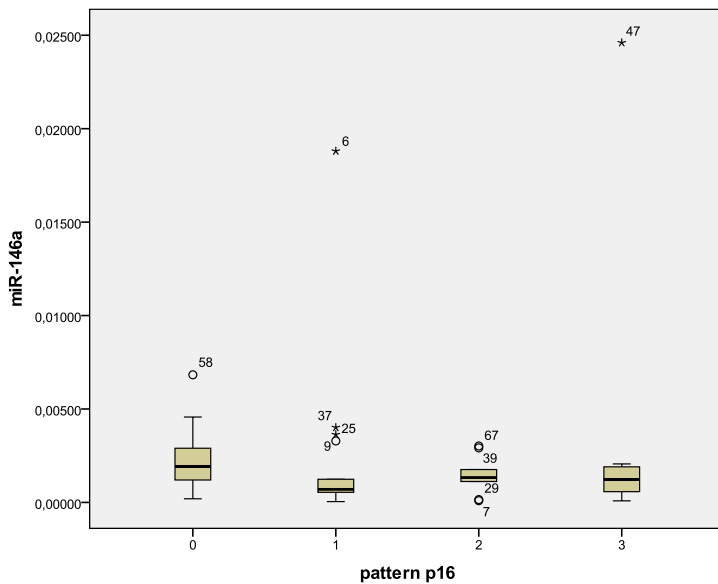


Fig.24 Livelli di miR-146a in lesioni del pene rispetto al pattern di espressione di p16INK4a.

L'espressione dei microRNA è stata messa in relazione anche con la presenza di HPV DNA, ma non è stata dimostrata alcuna associazione significativa, anche se i livelli di miR-146a tendevano ad essere più bassi nei campioni negativi per HR-HPV DNA (Fig.24).

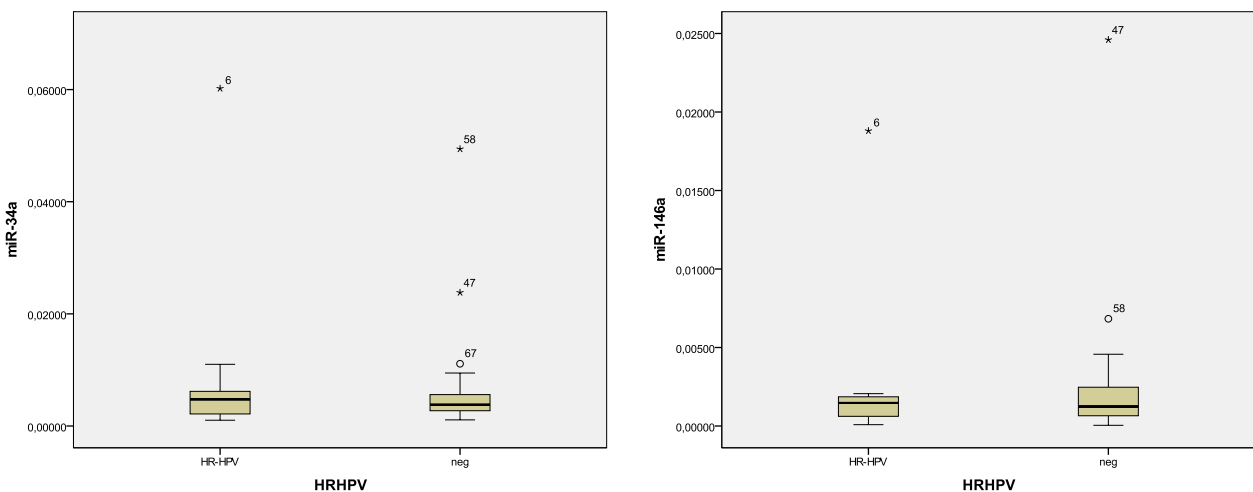


Fig.25 Livelli di miR-34a e miR-146a in lesioni del pene rispetto alla presenza di HR-HPV.

Nei tessuti di carcinoma e condiloma del pene i livelli di miR-34a, miR-146a, miR-196a e let-7c mostravano una correlazione diretta (test di regressione lineare, $P < 0,05$).

6. Il miR-146a diminuisce la proliferazione e la migrazione dei cheratinociti.

Tra i miRNA risultati avere un'espressione modulata significativamente dalle oncoproteine di HPV e con diversa espressione nelle neoplasie associate ad infezione da HPV rispetto ai tessuti normali, è stato scelto il miR-146a per ulteriori approfondimenti. Il miR-146a è risultato praticamente assente nei carcinomi del collo dell'utero e la sua espressione era ridotta nei campioni di carcinoma del pene rispetto ai condilomi. Inoltre, la sua espressione è risultata inibita da HPV16 E6, ma non da HPV16 E7, che ne induceva invece un lieve aumento. Questo miRNA, implicato nella regolazione in senso negativo della risposta immunitaria innata e dell'interferone (Taganov KD et al., 2006), è stato dimostrato essere indotto da oncoproteine virali con LMP1 di EBV (Cameron JE et al., 2008; Motch N et al., 2007), Tax di HTLV1 (Pichler K et al., 2008) e vFLIP (Punj V et al., 2010) di KSHV. In letteratura, l'espressione del miR-146a è riportata essere variabile nei tumori, essendo sovra-espresso in alcuni tipi di tumore, come nel carcinoma papillare della tiroide (He H et al., 2005; He H et al., 2008), nella leucemia mieloide acuta del età pediatrica e nella leucemia acuta linfoblastica (Zhang H et al., 2009) e down-regolato in altri tipi di tumore, come nelle cellule di carcinoma del pancreas (Li Y et al., 2010) e nel carcinoma della prostata (Lin SL et al., 2008). Wang e collaboratori (Wang et al., 2009) già avevano indagato questo miRNA e ne avevano osservato la sotto-espressione nei carcinomi cervicali invasivi, ma la valutazione sperimentale dell'attività di questo miRNA ha portato a risultati contraddittori. Abbiamo quindi deciso di valutare l'effetto dell'iperespressione del miR-146a in cheratinociti umani trasfettando stabilmente un plasmide esprime miR-146a nei cheratinociti e nelle cellule di carcinoma cervicale SiHa e CaSki. La proliferazione e la vitalità cellulare sono state valutate mediante saggio della BrdU e test MTT; è stato inoltre contato il numero di passaggi in coltura. Questi test hanno dimostrato una netta e significativa riduzione della replicazione dei cheratinociti e una meno marcata riduzione della proliferazione, anche se comunque significativa, delle cellule di cervico-carcinoma SiHa e CaSki che iper-esprimevano il miR-146a (Fig.26). Analoghi risultati sono stati ottenuti dal test MTT e dalla valutazione del numero di passaggi in coltura (Fig.27)

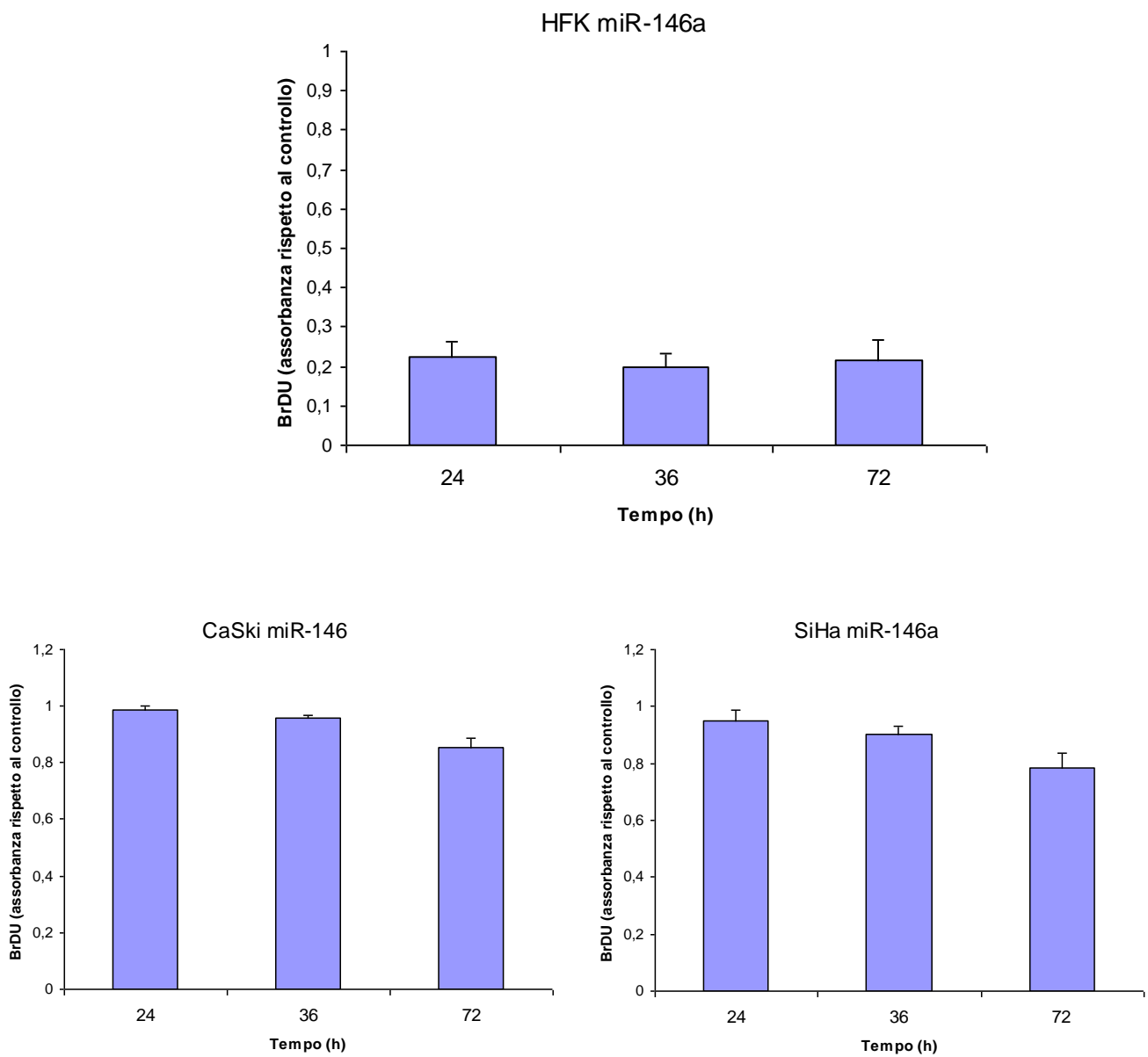


Fig.26 Rappresentazione grafica della proliferazione di cheratinociti umani (HFK) e delle linee tumorali CaSki e SiHa stabilmente trasfettate col miR-146a, stimata con il saggio della BrdU, rispetto alle stesse cellule trasfettate con il plasmide di controllo.

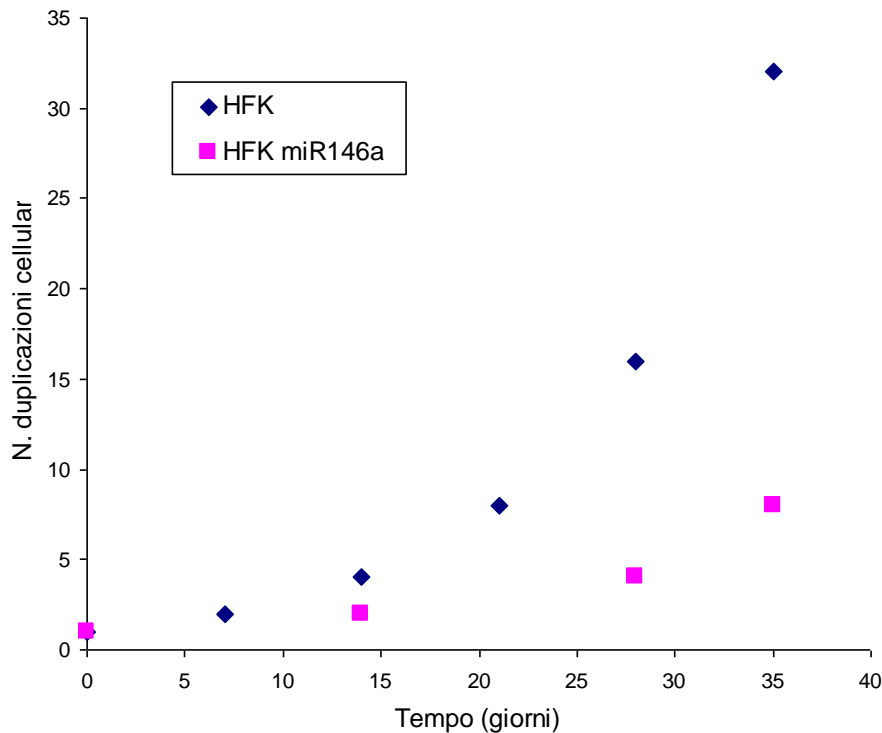
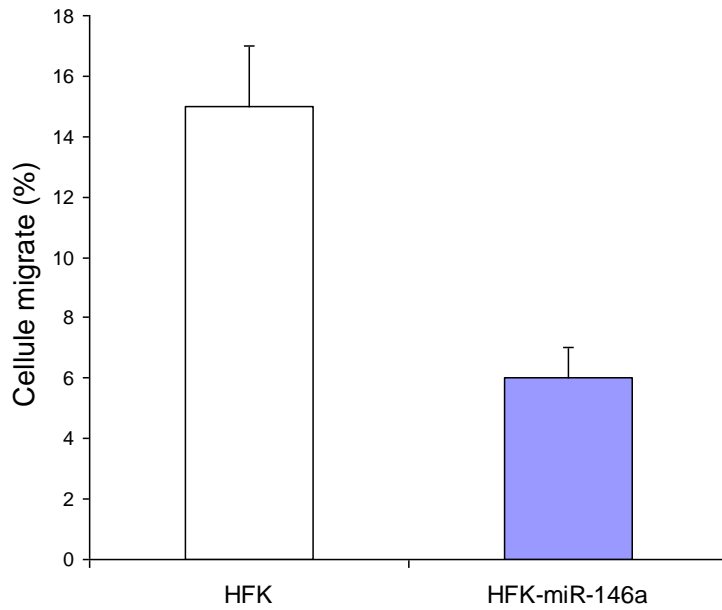


Fig.27 Rappresentazione grafica del tasso di duplicazione di cheratinociti umani (HFK) stabilmente trasfettati col miR-146a rispetto alle stesse cellule trasfettate con il plasmide di controllo.

L'effetto dell'espressione del miR-146a è stato valutato anche sulla capacità migratoria delle cellule stabilmente trasfettate col miR-146a (HFK-146a e SiHa-miR-146a) in confronto con le rispettive cellule trasfettate con il plasmide di controllo (HFK-mock e SiHa-mock). La migrazione cellulare è stata valutata utilizzando i filtri transwell (Costar, Cambridge, MA) con una dimensione dei pori di 8 μm . Le cellule che attraversano i pori dei filtri, dopo essere fissate, lavate e montate sul vetrino sono state contate usando un microscopio ottico (Leica). Ogni esperimento è stato fatto in triplicato. I risultati ottenuti hanno dimostrato una riduzione della migrazione dei cheratinociti stabilmente trasfettati col miR-146a rispetto al controllo (HFK-mock) (Fig. 28A/B), mentre le cellule SiHa-miR-146a mostravano un aumento della migrazione rispetto al controllo (Fig.29A/B).

A)



B)

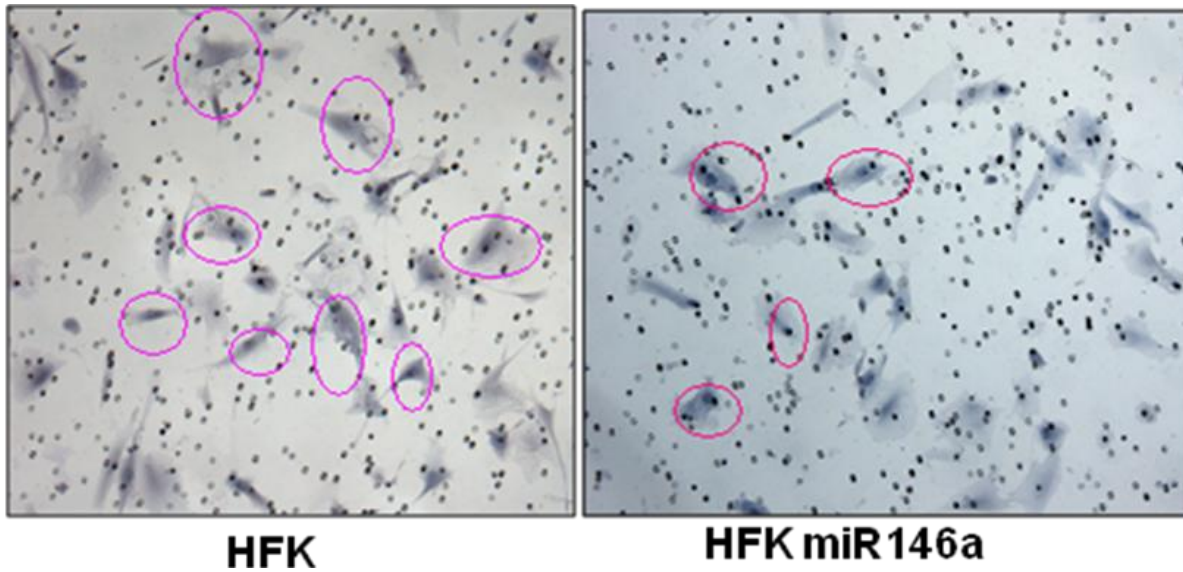
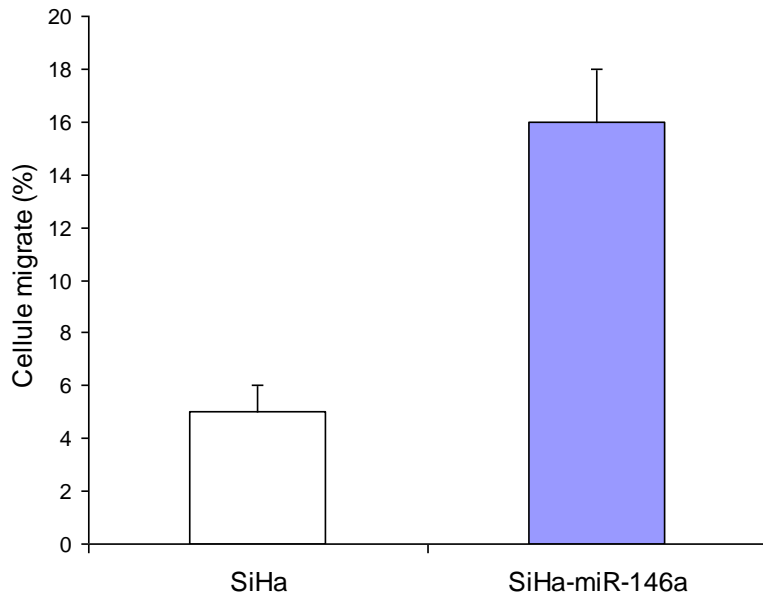


Fig.28 (A) Rappresentazione grafica dei risultati sulla migrazione dei cheratinociti stabilmente trasfettati col miR-146a e dei cheratinociti di controllo. **(B)** Immagini di cheratinociti trasfettati col miR-146a e controllo migrati sul filtro del transwell.

A)



B)

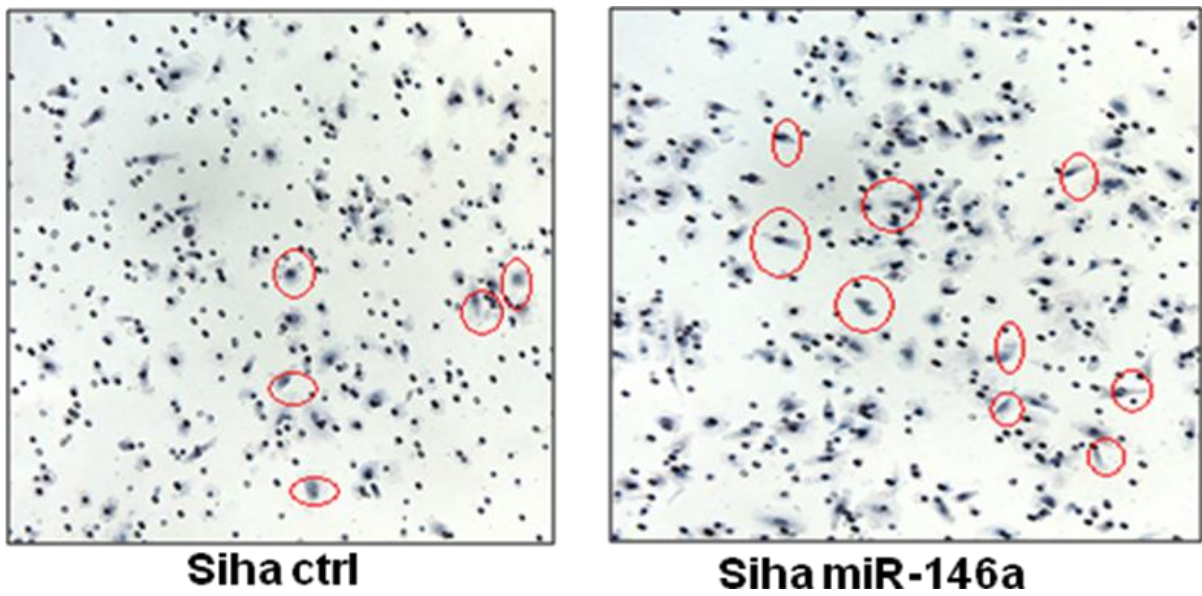


Fig.29 (A) Rappresentazione grafica dei risultati sulla migrazione delle cellule di cervico-carcinoma SiHa stabilmente trasfettate col miR-146a e delle cellule di controllo. (B) Immagini di cellule SiHa col miR-146a e controllo migrate sul filtro del transwell.

7. L'oncoproteina E6 di HPV16 attiva il promotore del miR-146a tramite NF-kB, c-Myc e IRF3/IRF7.

Per identificare il meccanismo attraverso cui E6 di HPV16 inibisce l'espressione del miR-146a è stato usato un plasmide reporter in cui la sequenza del promotore del miR-146a era inserita a monte del gene della luciferasi. Usando il software MATCH (Matrix Search for Transcription Factor Binding Sites) è stata predetta la presenza di putativi siti di legame per fattori di trascrizione sul promotore del microRNA. Sono stati identificati una serie di fattori di trascrizioni come Oct-1, c-Myc, IRF3/IRF7, AP-2, NF-kB (A e B), Ets, ZF5, HSF2 ecc, alcuni dei quali sono rappresentati nella figura 30. Mediante mutagenesi sito-specifica sono stati mutati i siti di legame per i fattori NF-kB, c-Myc, Oct-1, e IRF3/IRF7, come riportato in figura 30.

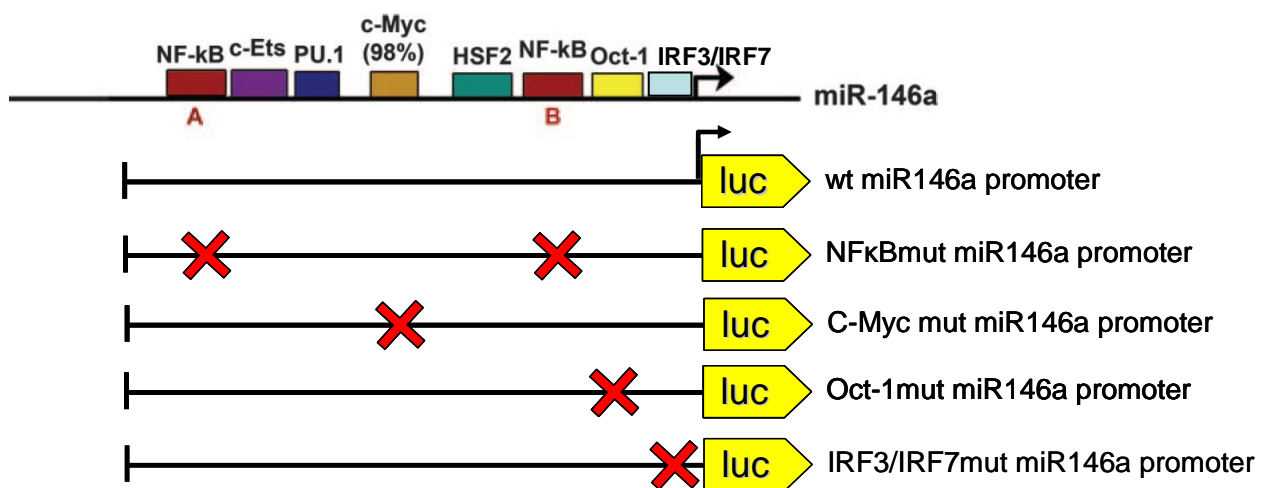


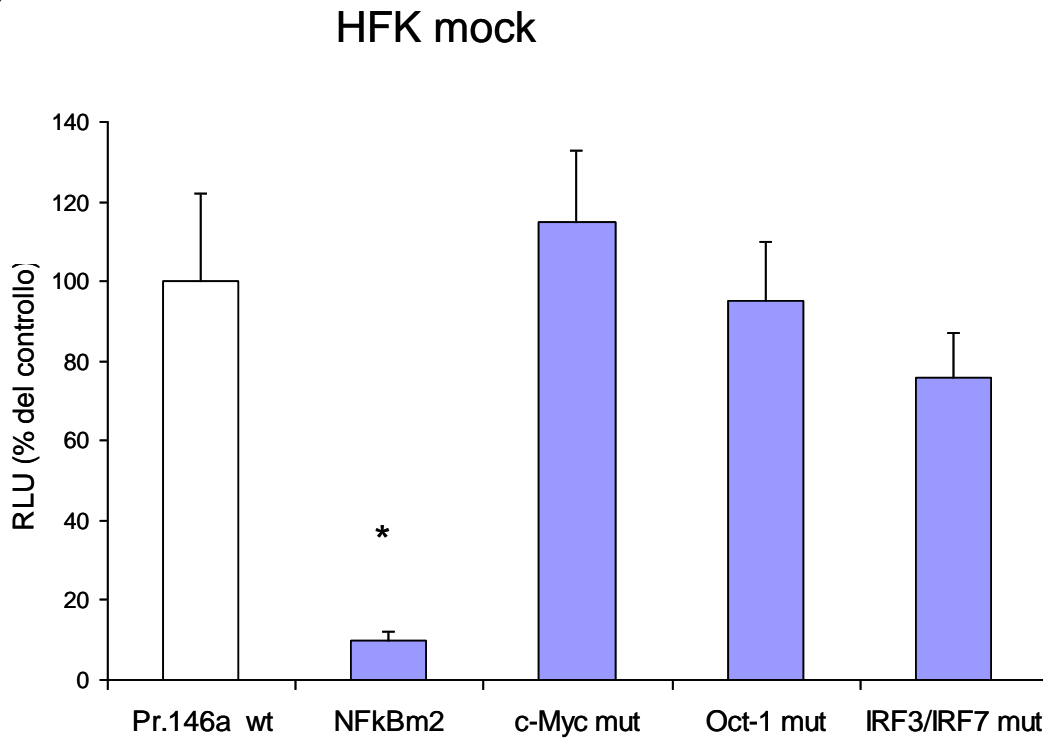
Fig.30 Rappresentazione schematica dei putativi siti di legame dei fattori di trascrizione sulla sequenza del promotore del miR-146a e dei plasmidi contenenti i la sequenza normale (wt) del miR-146a, e la sequenza mutata nei siti di legame rispettivamente per i fattori di trascrizione NF-kB, c-Myc, Oct-1, e IRF3/IRF7.

L'effetto dei fattori di trascrizione NF-kB, c-Myc, Oct-1 ed IRF3/IRF7 sul promotore del miR-146a è stato valutato trasfettando i plasmidi nei cheratinociti umani esprimenti la oncoproteina E6 di HPV16 e nei cheratinociti di controllo. I risultati ottenuti sono riportati nei grafici della figura 31.

Utilizzando il saggio della luciferasi, che consiste nel misurare l'attività del gene reporter della luciferasi che si trova a valle della sequenza di interesse, è stata misurata l'attività del promotore miR-146a normale, mutato nei due siti di legame del fattore di trascrizione NF-kB, mutato nel sito di legame di c-Myc, e mutato nel sito di legame del fattore di trascrizione Oct-1, e mutato nei due siti di legame dei fattori di trascrizione IRF3/IRF7, che si sovrappongono parzialmente. Come si può vedere dal grafico della figura 31A e B, la mutazione dei due siti di legame del fattore di trascrizione NF-kB, aboliscono del 90% l'attività del promotore del miR-146a sia nei cheratinociti

normali sia nei cheratinociti esprimenti la oncoproteina E6 di HPV16.

A)



B)

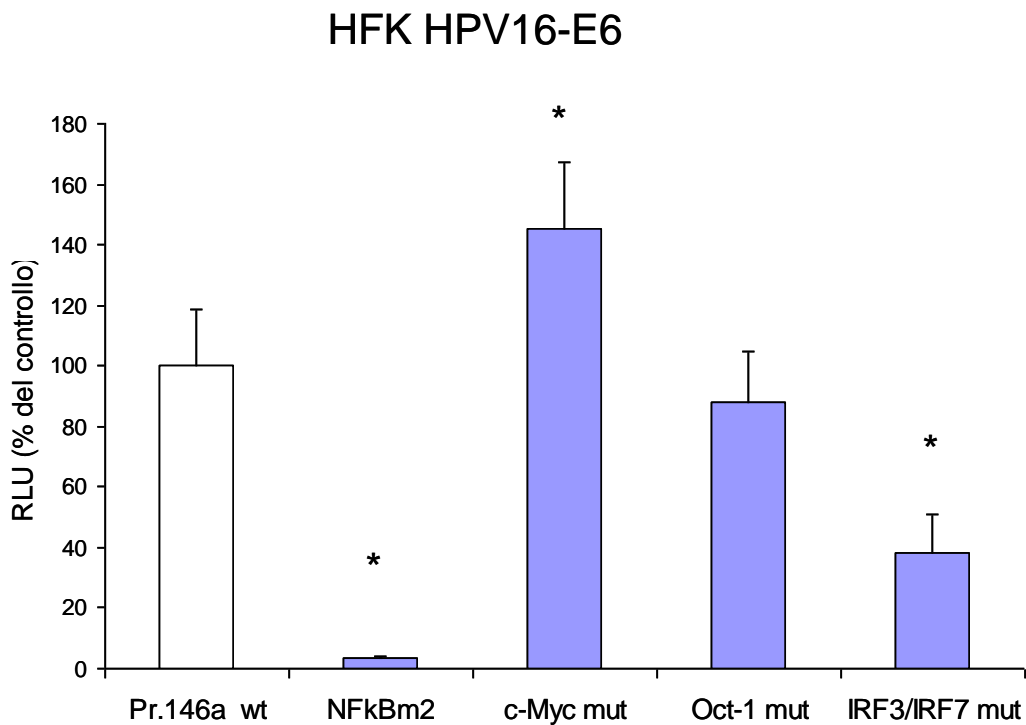


Fig.31 Rappresentazione grafica dell'attività del promotore del miR-146a misurato con saggio della luciferasi (A) nei cheratinociti normali e (B) nei cheratinociti esprimenti la oncoproteina E6 di HPV16. * $p \leq 0.005$, Student *t-test*.

Per quanto riguarda i fattori di trascrizione Oct-1 e IRF3/IRF7 (Fig.31A) la mutazione dei loro siti di legame nei cheratinociti normali non influisce significativamente sull'attività del promotore del

miR-146a, mentre nei cheratinociti esprimenti la oncoproteina E6 di HPV16 abbiamo ottenuto un quadro diverso (Fig.31B). Le mutazioni sul sito di legame del fattore Oct-1 influisce leggermente sull'attività del promotore, mentre le mutazioni sul sito di legame dei fattori di trascrizione IRF3/IRF7 aboliscono l'attività del promotore in modo significativo in presenza del E6 di HPV16 (Fig.31B). Al contrario, l'abolizione del sito di legame di c-Myc induce l'espressione del reporter, indicando così che c-Myc è un repressore trascrizionale del miR-146a. Concludendo il fattore di trascrizione NF-kB, induce l'espressione del miR-146a nei cheratinociti umani indipendentemente dalla espressione della oncoproteina virale E6 di HPV16, mentre i fattori di trascrizione IRF3/IRF7 sembrano indurre l'espressione del miR-146a solo in presenza della oncoproteina E6 di HPV16, mentre c-Myc ne reprime l'espressione.

DISCUSSIONE

In questo studio sono stati ricercati i microRNA cellulari la cui espressione fosse modificata dalle oncoproteine E6 ed E7 di HPV. E' stata dimostrata la significativa soppressione dell'espressione del miR-34a da parte di HPV16 E6, in accordo con i dati della letteratura e con il suo ruolo di effettore di p53. E' stato dimostrato che E7 di HPV16, invece, induce l'espressione di altri miRNA della famiglia miR-34, ovvero il miR-34b ed il miR-34c-5p, oltre ai miR-15b, miR-16 e miR-486-5p, mentre inibisce l'espressione dei miR-22, miR-29b e miR-29c. E6 ed E7 di HPV16 esercitavano un effetto opposto sull'espressione di alcuni microRNA cellulari, tra i quali il miR-146a, il quale era inibito da E6 ed indotto da E7. Inoltre, l'espressione del miR-146a è risultata praticamente assente nelle linee cellulari di carcinoma del collo dell'utero. I geni E6 ed E7 di HPV6, un HPV a basso rischio oncogeno, a differenza di quelli di HPV16, non hanno portato alla modificazione significativa dell'espressione di alcun microRNA cellulare. L'espressione dei microRNA più rilevanti e associati all'attività di E6/E7 di HPV16 è stata analizzata in casistiche di campioni citologici cervicali e di carcinomi e condilomi del pene, per verificarne la correlazione con l'infezione da HPV ad alto rischio oncogeno (HR-HPV). In questi campioni è stato confermato che l'infezione da HPV oncogeni si associa ad una significativa riduzione dell'espressione dei miR-34a/b/c, miR-218, miR-210 e dei microRNA della famiglia let-7. Tuttavia, considerando l'espressione dei trascritti E6/E7 degli HR-HPV, e non la sola presenza del DNA di HR-HPV, si è osservato che la presenza dei trascritti virali si associava alla *down-regulation* del miR-34a e all'*up-regulation* del miR-34c. Sequenze genomiche di HPV oncogeni sono state riscontrate nel 30% dei carcinomi squamosi del pene, mentre tutti i condilomi del pene erano positivi per gli HPV a basso rischio HPV6 o HPV11. In questi campioni, i livelli di miR-34a erano più elevati nei carcinomi che nei condilomi; il miR-218 era più elevato nei carcinomi HR-HPV-positivi che in quelli HR-HPV-negativi; inoltre, i livelli di miR-146a erano più bassi nei campioni p16INKa-positivi (marcatore di infezione da HR-HPV) che in quelli p16INKa-negativi e, in accordo, più bassi nei campioni positivi per HR-HPV che in quelli negativi. Nei cheratinociti normali e nelle linee cellulari di cervico-carcinoma, la sovra-espressione del miR-146a ha portato ad una significativa riduzione della proliferazione e della migrazione cellulare. Infine, mediante mutagenesi sito-specifica nel promotore del miR-146a è stato dimostrato che nei cheratinociti la repressione dell'espressione del miR-146a da parte di E6 di HPV16 è mediata principalmente da c-Myc.

Le oncoproteine E6 ed E7 di HPV16 sono due fattori fondamentali per la trasformazione cellulare durante l'infezione dal HPV (Laimonis AL & Moddy AC, 2010). Questi due oncogeni collaborano tra di loro e reprimono o inducono delle vie cellulari in modo diretto ma anche indirettamente, e questa cooperazione potrebbe avvenire anche nella modulazione dei microRNA cellulari.

Nel presente studio, l'effetto più evidente e marcato dell'espressione dell'oncoproteina HPV16-E6 nei cheratinociti umani, ma anche nei fibroblasti, è stato la soppressione del miR-34a, come è stato confermato sia dal test statistico SAM sia dal test ANOVA. Questi risultati sono in accordo con quanto dimostrato da Wang e collaboratori in colture organotipiche di cheratinociti infettati con HPV16 e HPV18 (Wang X et al., 2009). La famiglia dei miR-34a e miR-34b/c è ben nota per la sua attività di oncosoppressore. L'espressione dei microRNA della famiglia miR-34 è regolata da p53, che si lega direttamente al loro promotore (Hemerking H., 2009). L'espressione ectopica dei miR-34a e miR-34b/c induce l'apoptosi cellulare, l'arresto del ciclo cellulare o la senescenza cellulare, mentre l'inibizione dell'espressione del miR-34a è stata collegata alla resistenza all'apoptosi. HPV16-E6 induce la degradazione ubiquitina-dipendente tramite proteosoma di p53 (Laimonis AL & Moddy AC, 2010); interferisce inoltre con la funzione di p53 legandosi alle proteine istoni acetiltrasferasi p300 e CREB binding protein, bloccando la loro capacità di indurre l'acetilazione di p53 (Zimmermann H et al., 1999). E' quindi probabile che la soppressione dei miR-34 da parte di HPV16-E6 dipenda dall'inattivazione di p53. Coerentemente, nella linea di carcinoma della cervice uterina C33A, HPV-negativa e con mutazione inattivante di p53, l'espressione dei miR-34/b/c era quasi assente.

Il miR-34c ha come target l'oncogene c-Myc e risulta indotto, in seguito ai danni del DNA, sia da parte di p53 ma anche in assenza di p53, da parte della via delle chinasi p38MAPK/MK2 (Cannell IG et al., 2010). c-Myc, durante la tumori genesi, si lega a dei complessi di proteine che controllano la replicazione del DNA, aumentando la replicazione del DNA e di conseguenza inducendo l'accumulo di mutazioni. Il miR-34c riconosce una sequenza altamente conservata sulla sequenza 3'UTR del trascritto di c-Myc e ne reprime la traduzione (Cannell IG et al, 2010) .

Il miR-34b si comporta da soppressore tumorale sia nelle linee di carcinoma della mammella contenenti p53 normale che nelle linee cellulari di carcinoma ovarico ed endometriale, ma non nelle linee di carcinoma della mammella nella quali p53 è mutato. Nella cellule di carcinoma della mammella, il miR-34b è stato dimostrato avere come target la ciclina D1 e la proteina Jag-1 (ligando del recettore Notch) (Lee YM et al., 2011).

L'oncoproteina E7 di HPV16, contrariamente ad E6, induce l'espressione di p53 in seguito al danno provocato al DNA e all'attivazione della *pathway* ATM-ATR (ataxia telangiectasia-mutated-ATM and RAD3-related DNA damage response). La co-espressione di E6 ed E7 abroga

l'apoptosi p53-dipendente in risposta all'attività di E7, consentendo così la replicazione cellulare nonostante la presenza di danni del DNA e instabilità cromosomica (Moody & Laimins 2010). L'induzione di p53 da parte di E7 spiega l'up-regolazione dei miR-34b e 34c-5p nelle cellule HPV16-E7-positive, ma è anche interessante notare come le due oncoproteine E6 ed E7 abbiano effetto su diversi membri della famiglia miR-34. A questo riguardo, altri fattori che regolano l'espressione dei miR-34 potrebbero intervenire nelle *pathway* di E6 ed E7, come il fattore c-Myc. La oncoproteina E7 induce la degradazione del soppressore tumorale pRB, di conseguenza il fattore di trascrizione E2F, che si trova libero nella cellula, può a sua volta indurre l'espressione di c-Myc (Zheng MZ. e Wang X. 2011). L'induzione di c-Myc da parte di E7 di HPV16 giustifica l'aumento dell'espressione del miR-34c-5p nei cheratinociti umani come meccanismo di difesa della cellula ospite che mantiene ancora p53 attivo (Lee YM et al., 2011). Il miR-34a invece viene inibito da c-Myc nei linfomi B (Craig VJ et al., 2011), mentre è inibito da vie indipendenti da p53 nel processo di senescenza cellulare (Christoffersen NR et al., 2010). Inoltre, pur appartenendo alla stessa famiglia e avendo una *seed sequence* molto simile, hanno alcuni target diversi, tra cui c-Myc e N-Myc, che sono target dei miR34b e miR-34c, ma non del miR-34a (Hermeking H. 2010). La diversa regolazione dei microRNA della famiglia miR-34 da parte di E6 ed E7 di HR-HPV è stata da noi confermata in campioni citologici cervicali. Particolarmente interessante è il fatto che il pattern caratterizzato dalla down-regolazione di miR-34a, ma non dei miR-34b e miR-34c, era presente nei campioni in cui era rilevabile l'mRNA di E6/E7 di HR-HPV, ma non nei campioni negativi alla ricerca dei trascritti di HR-HPV. L'analisi del profilo di espressione dei miR-34 potrebbe quindi essere un utile marcatore di rischio di progressione delle lesioni da HPV.

L'espressione del miR-34a, oltre che di altri miRNA HPV-correlati (miR-145, miR-146a, miR-23b, miR-218, miR-196a, miR-34a, e let-7c) è stata analizzata mediante real-time qRT-PCR su una casistica di carcinomi (30% dei quali HR-HPV-positivi) e condilomi del pene (tutti positivi per HPV a basso rischio). I livelli di miR-34a sono risultati più elevati nei carcinomi che nei condilomi e più bassi nei carcinomi HR-HPV-positivi che in quelli negativi. L'espressione del miR-34a non correlava però con l'espressione di p53 né di p16INK4a.

Nel nostro studio, nei cheratinociti normali, HPV16-E6 inibiva in modo significativo anche l'espressione del miR-1915, il quale ha come target l'oncogene Bcl-2 (Xu K et al., 2011). Inoltre, quasi tutti i microRNA della famiglia dei let-7, noti oncosoppressori, erano sottoespressi nei cheratinociti esprimenti la oncoproteina HPV16-E6, mentre nei cheratinociti esprimenti la proteina HPV16-E7 solo il miR-let-7e risultava sottoespresso. Anche nelle linee di carcinoma e nei fibroblasti umani HPV16 E6- o E7-positivi, i microRNA di questa famiglia erano meno espressi.

Nella nostra casistica, l'espressione dei microRNA della famiglia let-7 è risultata inferiore nei campioni citologici positivi per HR-HPV rispetto a quelli HR-HPV-negativi.

Un altro microRNA sottoespresso sia nei cheratinociti che nei fibroblasti esprimenti la oncoproteina E6 di HPV16 che nella linea tumorale C33A, è risultato essere il miR-23b. Au Yeung e collaboratori hanno dimostrato che l'attivatore del plasminogeno urokinasi (uPA) è un target del miR-23b e che l'espressione della oncoproteina HPV16-E6 induce la diminuzione dell'espressione del miR-23b con conseguente aumento della migrazione cellulare delle linee di carcinoma della cervice uterina CaSki e SiHa (Au Yeung CL et al., 2011). Il miR-23b, come il miR-34a, contiene un sito di legame per p53 sul suo promotore; di conseguenza, questo microRNA non viene indotto nelle cellule con p53 mutato o inattivato.

Nel presente studio, l'espressione della oncoproteina E7 di HPV16 nei cheratinociti umani induceva un aumento significativo dell'espressione del cluster dei miR-15/16-1, in accordo con quanto dimostrato in colture organotipiche di cheratinociti (Wang X & Zheng ZM, 2011) e in biopsie di carcinomi anali HPV-correlati (Myklebust MP et al., 2011). Il cluster miR-15a/miR-16-1 si trova all'interno dell'introne del gene non codificante *DLEU2*, spesso mutato nei pazienti affetti dalla leucemia linfatica cronica (Calin GA et al., 2002). L'espressione del cluster dei miR-15a/16-1 dipende dal promotore del gene *DLEU2*, il quale è controllato dal legame di c-Myb e dei PPAR in modo positivo e dal legame di c-Myc in modo negativo (Zhao H et al., 2009; Yin KJ et al., 2010; Chang TC et al., 2008). Il fattore di trascrizione E₂F attiva la trascrizione di c-Myb, ma reprime la trascrizione di c-Myc (Sala A et al., 1994). Quindi, l'aumento dell'espressione dei miR-15a/16-1 in presenza della oncoproteina E7 di HPV16 potrebbe dipendere dall'inattivazione di pRB da parte di E7, con conseguente aumento della quantità di E₂F libero rilasciato dal complesso E₂F-pRB, il quale si lega al promotore di c-Myb e c-Myc. Il cluster dei miR15a/16-1, che è in grado di inibire la proliferazione cellulare e promuovere l'apoptosi sia *in vitro* che *in vivo*, è significativamente sottoespresso anche nel carcinoma della prostata, nell'adenoma surrenale e nella leucemia linfatica cronica (Aqeilan RI et al., 2010).

Dall'analisi statistica del profilo di espressione dei microRNA nei cheratinociti e nei fibroblasti umani esprimenti le oncoproteine E6/E7 di HPV16/HPV6, ed anche nelle linee di carcinoma della cervice uterina HPV-positive (CaSki e SiHa) e HPV-negative (C33A), l'espressione del miR-146a è risultata alterata rispetto alle cellule di controllo. In particolare, nelle linee tumorali, il miR-146a è risultato significativamente e marcatamente sottoespresso rispetto ai cheratinociti normali. Nei cheratinociti umani esprimenti le proteine E6/E7 di HPV16 invece, il quadro di espressione era diverso: nei cheratinociti esprimenti E6, tale microRNA risultava significativamente sottoespresso, mentre nei cheratinociti esprimenti E7 il miR-146a risulta sovraespresso. Per quando riguarda i

fibroblasti umani, il miR-146a risultava significativamente sovraespresso sia nelle cellule HPV16-E6-positive sia in quelle HPV16-E7-positive. Abbiamo quindi deciso di approfondire lo studio sull'attività di questo miR-146a nei cheratinociti ed sui meccanismi della sua regolazione da parte di HPV.

Un studio precedente (Wang X et al., 2008) ha dimostrato alti livelli di espressione del miR-146a in campioni clinici di carcinoma cervicale ed una espressione quasi assente dello stesso microRNA nelle linee cellulari di carcinoma della cervice uterina (CaSki, SiHa e C33A). In questo studio, il miR-146a risultava poco espresso in colture di cheratinociti umani in monostrato e in colture organotipiche HPV18-positive. La sua trasfezione transiente in cellule di carcinoma cervicale HeLa e nelle cellule del carcinoma colo-rettale HCT116 portava un aumento lento, ma significativo, della proliferazione cellulare (Wang X et al., 2009), contrariamente a quanto da noi osservato, ovvero una significativa inibizione della proliferazione cellulare e della capacità migratoria dei cheratinociti. In accordo con i nostri dati, in miR-146a è stato dimostrato avere un ruolo di soppressore tumorale in diverse neoplasie, come il carcinoma gastrico (Hou Z et al., 2011), il carcinoma del pancreas (Li Y et al., 2010), il carcinoma della prostata (Lin SL et al., 2008) e il carcinoma della mammella (Hurst DR et al., 2009), nelle quali la ridotta espressione correla con un basso grado di differenziamento cellulare e con una maggiore invasività. Al contrario, il miR-146a è stato riportato essere significativamente sovra-espresso nel carcinoma papillare della tiroide (He H et al., 2005; HE H et al., 2008), nella leucemia mieloide acuta e nella leucemia linfoblastica acuta (Zhang H et al., 2009). Target validati del miR-146a sono IRAK-1 (recettore associato della interleuchina chinasi 1), TRAF-6 (fattore associato al recettore per il TNF-6), CXCR4, EGFR, ROCK1, ecc., i quali ne mediano l'attività antitumorale e di inibizione dell'immunità innata. In uno studio recente, sono stati prodotti dei topi *knock-out* per il gene del miR-146a con lo scopo di esaminarne il ruolo biologico (Boldin MP et al., 2011). I topi *knock-out* per il gene del miR-146a erano ipersensibili al LPS ed erano caratterizzati da una *iper*-proliferazione delle cellule mieloidi. I topi *knock-out* cominciavano a manifestare tumori nei loro organi linfoidi secondari con l'aumento dell'età e la milza era l'organo maggiormente colpito dai tumori (Boldin MP et al., 2011).

L'espressione del miR-146a è attivata dal fattore di trascrizione NF-kappaB, che ha sue siti di legame nel suo promotore (Taganov KD et al., 2006). Inoltre, i miR-146a e miR-146b regolano negativamente l'attività del NF-kappaB (Bhaumik D et al., 2008; Hurst DR et al., 2009). Nel nostro studio, il fattore di trascrizione NF-kB è stato dimostrato essere necessario per mantenere l'espressione basale del miR-146a nei cheratinociti umani indipendentemente dall'espressione di HPV16-E6, mentre l'espressione di HPV16-E6 è sembrata rilevante per l'attivazione mediata dai fattori di trascrizione IRF3/IRF7 e per l'inibizione da parte di c-Myc. L'attività di inibizione del

promotore del miR-146a da parte di c-Myc è già stata suggerita in letteratura (Chang TC et al., 2007). C-Myc è stato dimostrato reprimere l'espressione di molti microRNA cellulari, come let-7a-1/f-1/d, miR-15a/16-1, miR-22, miR-26a-2, miR-26b, miR-29a/b-1, miR-29b-2/c, miR-30e/30c-1, miR-34a, and miR-146a legandosi direttamente ai loro promotori (Chang TC et al., 2007). I fattori di regolazione dell'interferone (IRF-3 e IRF-7) sono due fattori importanti per l'attivazione della risposta immunitaria innata della cellula ospite durante un'infezione virale. Nel lavoro di Oldak M e collaboratori (Oldak M et al., 2011), IRF-3 e IRF-7 sono stati riportati a regolare la trascrizione di HPV8 con effetti opposti. IRF-7 si trova espresso nello strato soprabasale dell'epitelio e stimola l'espressione dei geni tardivi legandosi direttamente al DNA del beta-papillomavirus HPV8, mentre IRF3 si trova espresso in tutti gli strati dell'epidermide e sopprime l'espressione dei geni di HPV8 (Oldak M et al., 2011). L'effetto del IRF-3 prevale sul IRF-7 e costituisce una specie di immunità cellulare contro il virus. Il sito di legame di IRF-3 e IRF-7 si sovrappongono sul promotore del miR-146a, per cui saranno eseguiti ulteriori esperimenti per capire l'effetto specifico di ciascun fattore sull'espressione del miR-146a.

Molte oncoproteine virali inducono l'espressione del miR-146a tramite NF- κ B, come la proteina latente di membrana 1 (LMP1) del virus di Epstein-Barr (EBV), la quale mima la funzione del recettore del TNF e induce l'espressione del miR-146a tramite NF- κ B (Cameron JE et al., 2008; Motch N et al., 2007); il virus della leucemia a cellule T dell'uomo di tipo 1 (HTLV-1) codifica Tax che aumenta l'espressione del miR-146a interagendo direttamente col NF- κ B (Pichler K et al., 2008); Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) codifica la proteina vFLIP K13, la quale interagisce con il complesso della chinasi I-kappa (IKK) attivando la via di segnale del NF- κ B per poi indurre significativamente l'attività del promotore del miR-146a (Punj V et al., 2010). Al contrario, come dimostrato nel nostro studio, l'oncoproteina E6 di HPV16 inibisce l'espressione del miR-146a nei cheratinociti, mentre ne induce marcatamente l'espressione nei fibroblasti normali. In effetti, la modulazione dell'espressione del miR-146a dipende da molteplici fattori di trascrizione cellulari, la cui presenza e quantità può variare da cellula a cellula e da tessuto a tessuto. Nei cheratinociti, comunque, l'effetto rilevante di HPV16-E6 è l'inibizione dell'espressione, mentre E7 aumenta l'espressione del miR-146a, e c-Myc appare essere il fattore di trascrizione più rilevante in questa regolazione.

In conclusione, questo studio ha portato all'identificazione dei microRNA modulati dalle oncoproteine E6 ed E7 degli HR-HPV e ne ha confermato l'anomala espressione in campioni clinici cervicali e penieni con infezione da HR-HPV. Questo studio ha inoltre caratterizzato l'attività antiproliferativa nei cheratinociti del miR-146a, il quale è down-regolato da E6 di HR-HPV.

Bibliografia

Aqeilan RI, Calin GA, Croce CM. miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives. *Cell Death Differ.* 2010 Feb;17(2):215-20.

Arbeit, J. M., Howley, P. M. & Hanahan, D. Chronic estrogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 2930–2935 (1996).

Au Yeung CL, Tsang TY, Yau PL, Kwok TT. Human papillomavirus type 16 E6 induces cervical cancer cell migration through the p53/microRNA-23b/urokinase-type plasminogen activator pathway. *Oncogene.* 2011 May 26;30(21):2401-10.

Backes DM, Kurman RJ, Pimenta JM, Smith JS Systematic review of human papillomavirus prevalence in invasive penile cancer. *Cancer Causes Control.* 2009 May;20(4):449-57.

Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, Patil CK, Campisi J, Benz CC. Expression of microRNA-146 suppresses NF-kappaB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells. *Oncogene.* 2008 Sep 18;27(42):5643-7.

Boldin MP, Taganov KD, Rao DS, Yang L, Zhao JL, Kalwani M, Garcia-Flores Y, Luong M, Devrekanli A, Xu J, Sun G, Tay J, Linsley PS, Baltimore D miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *J Exp Med.* 2011 Jun 6;208(6):1189-201.

Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, et al. A review of human carcinogens - Part B: biological agents. *Lancet Oncol* 2009;10:321-2.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Nov 26;99(24):15524-9.

Calin GA, Liu CG, Sevignani C, et al . MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 11755–11760.

Cameron JE, Yin Q, Fewell C, Lacey M, McBride J, Wang X, Lin Z, Schaefer BC, Flemington EK. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces cellular MicroRNA miR-146a, a modulator of lymphocyte signaling pathways. *J Virol.* 2008 Feb;82(4):1946-58. Epub 2007 Dec 5.

Cannell IG, Kong YW, Johnston SJ, Chen ML, Collins HM, Dobbyn HC, Elia A, Kress TR, Dickens M, Clemens MJ, Heery DM, Gaestel M, Eilers M, Willis AE, Bushell M. p38 MAPK/MK2-mediated induction of miR-34c following DNA damage prevents Myc-dependent DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Mar 23;107(12):5375-80.

Chang TC, Yu D, Lee YS, Wentzel EA, Arking DE, West KM, Dang CV, Thomas-Tikhonenko A, Mendell JT. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Source Nat Genet*. 2007 Jan;40(1):43-50.

Chang TC, Yu D, Lee YS, Wentzel EA, Arking DE, West KM, Dang CV, Thomas-Tikhonenko A, Mendell JT. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet*. 2008 Jan;40(1):43-50.

Christoffersen NR, Shalgi R, Frankel LB, Leucci E, Lees M, Klausen M, Pilpel Y, Nielsen FC, Oren M, Lund AH. p53-independent upregulation of miR-34a during oncogene-induced senescence represses MYC. *Cell Death Differ*. 2010 Feb;17(2):236-45.

Craig VJ, Cogliatti SB, Imig J, Renner C, Neuenschwander S, Rehrauer H, Schlapbach R, Dirnhofer S, Tzankov A, Müller A. Myc-mediated repression of microRNA-34a promotes high-grade transformation of B-cell lymphoma by dysregulation of FoxP1. *Blood*. 2011 Jun 9;117(23):6227-36.

Cubilla AL, Lloveras B, Alejo M, Clavero O, Chaux A, Kasamatsu E, Velazquez EF, Lezcano C, Monfuleda N, Tous S, Alemany L, Klaustermeier J, Muñoz N, Quint W, de Sanjose S, Bosch FX. The basaloid cell is the best tissue marker for human papillomavirus in invasive penile squamous cell carcinoma: a study of 202 cases from Paraguay. *Am J Surg Pathol*. 2010 Jan;34(1):104-14;

Cubilla AL, Lloveras B, Alejo M, Clavero O, Chaux A, Kasamatsu E, Monfuleda N, Tous S, Alemany L, Klaustermeier J, Muñoz N, Quint W, de Sanjose S, Bosch FX. Value of p16(INK)⁴(a) in the pathology of invasive penile squamous cell carcinomas: A report of 202 cases. *Am J Surg Pathol*. 2011 Feb;35(2):253-61.

de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, Tous S, Felix A, Bravo LE, Shin HR, Vallejos CS, de Ruiz PA, Lima MA, Guimera N, Clavero O, Alejo M, Llombart-Bosch A, Cheng-Yang C, Tatti SA, Kasamatsu E, Iljazovic E, Odida M, Prado R, Seoud M, Grce M, Usubutun A, Jain A, Suarez GA, Lombardi LE, Banjo A, Menéndez C, Domingo EJ, Velasco J, Nessa A, Chichareon SC, Qiao YL, Lerma E, Garland SM, Sasagawa T, Ferrera A, Hammouda D, Mariani L, Pelayo A, Steiner I, Oliva E, Meijer CJ, Al-Jassar WF, Cruz E, Wright

TC, Puras A, Llave CL, Tzardi M, Agorastos T, Garcia-Barriola V, Clavel C, Ordi J, Andújar M, Castellsagué X, Sánchez GI, Nowakowski AM, Bornstein J, Muñoz N, Bosch FX; Retrospective International Survey and HPV Time Trends Study Group. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol.* 2010 Nov;11(11):1048-56.

de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. "Classification of Papillomaviruses." *Virology*, 2004; 324:17-27.

Di Camillo B, Toffolo G, Nair SK, Greenlund LJ, and Cobelli C. Significance analysis of microarray transcript levels in time series experiments. *BCM Bioinformatics* 2007; 8 (Suppl 1): S10

Di Leva G, Croce C.M. Roles of small RNAs in tumor formation, *Trends Mol. Med.* 16 (2010) 257–267.

Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J. Clin. Virol*, 2005; 32S: S7–S15.

Ekström J, Bzhalava D, Svenback D, Forslund O, Dillner J. High throughput sequencing reveals diversity of Human Papillomaviruses in cutaneous lesions. *Int J Cancer.* 2011 Dec 1;129(11):2643-50. doi: 10.1002/ijc.26204. Epub 2011 Aug 8.

Farazi TA, Spitzer JI, Morozov P and Tuschl T. miRNAs in human cancer. *J Pathol* 2011; 223: 102–115.

G. Di Leva, C.M. Croce, Roles of small RNAs in tumor formation, *Trends Mol. Med.* 16 (2010) 257–267.

Gauwerky CE, Huebner K, Isobe M, et al . Activation of MYC in a masked t(8;17) translocation results in an aggressive B-cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 8867–8871.

Giuliano AR, Tortolero-Luna G, Ferrer E, Burchell AN, de Sanjose S, Kjaer SK, Muñoz N, Schiffman M, Bosch FX. Epidemiology of human papillomavirus infection in men, cancers other than cervical and benign conditions. *Vaccine.* 2008 Aug 19;26 Suppl 10:K17-28.

Greco D, Kivi N, Qian K, Leivonen SK, Auvinen P, Auvinen E. Human papillomavirus 16 E5 modulates the expression of host microRNAs. *PLoS One.* 2011;6(7):e21646.

Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol.* 2008 May;10(5):593-601.

Hatley ME, Patrick DM, Garcia MR, Richardson JA, Bassel-Duby R, van Rooij E, Olson EN. Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA-21. *Cancer Cell*. 2010 Sep 14;18(3):282-93.

Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J*. 1989 Dec 1;8(12):3905-10.

He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S, Calin GA, Liu CG, Franssila K, Suster S, Kloos RT, Croce CM, de la Chapelle A. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Dec 27;102(52):19075-80.

Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ*. 2010 Feb;17(2):193-9.

Hou J, Wang P, Lin L, Liu X, Ma F, An H, Wang Z, Cao X. MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. *J Immunol*. 2009 Aug 1;183(3):2150-8. Epub 2009 Jul 13.

HouZ,XieL,YuL,QianX,LiuB.MicroRNA146a is downregulated in gastric cancer and regulates cell proliferation and apoptosis. *Med Oncol*. 2011 Feb 24.

Howley PM, Douglas RL. "Papillomaviruses". In: *Fields Virology 5th edition*, Ed. Knipe D & Howley PM. *Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia*, 2007; p. 2299-2354.

Hu X, Schwarz JK, Lewis JS Jr, Huettner PC, Rader JS, Deasy JO, Grigsby PW, Wang X. A microRNA expression signature for cervical cancer prognosis. *Cancer Res*. 2010 Feb 15;70(4):1441-8.

Hurst DR, Edmonds MD, Scott GK, Benz CC, Vaidya KS, Welch DR. Breast cancer metastasis suppressor 1 up-regulates miR-146, which suppresses breast cancer metastasis. *Cancer Res*. 2009 Feb 15;69(4):1279-83.

I tumori in Italia–Rapporto 2006. E&P, anno 30, gennaio-febbraio 2006, suppl. 2.

IARC. Cancer Incidence in Five Continents, Vol. IX IARC Scientific Publications No. 160. Lyon: IARC, 2007

Iliopoulos D, Jaeger SA, Hirsch HA, Bulyk ML, Struhl K. STAT3 activation of miR-21 and miR-181b-1 via PTEN and CYLD are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer. *Mol Cell*. 2010 Aug 27;39(4):493-506.

- Jacobs MV, Snijders PJ, van den Brule AJ, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Walboomers JM. A general primer GP5+/GP6(+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiol*, 1997;35:791-5.
- James MA, Lee JH, Klingelutz AJ. Human papillomavirus type 16 E6 activates NF κ B, induces cIAP-2 expression, and protects against apoptosis in a PDZ binding motif-dependent manner. *J Virol* 2006; 80:5301-5307.
- Korpala M, Lee ES, Hu G, Kang Y. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem*. 2008 May 30;283(22):14910-4.
- Kumar MS, Lu J, Mercer KL, et al . Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* 2007; 39: 673–677.
- Kumar MS, Pester RE, Chen CY, et al . Dicer1 functions as a haploinsufficient tumor suppressor. *Genes Dev* 2009; 23: 2700–2704.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, et al . Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 2002; 12: 735–739.
- Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, et al . An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294: 858–862.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75: 843–854.
- Lee YM, Lee JY, Ho CC, Hong QS, Yu SL, Tzeng CR, Yang PC, Chen HW. MicroRNA 34b as a tumor suppressor in estrogen-dependent growth of breast cancer cells. *Breast Cancer Res*. 2011 Nov 23;13(6):R116.
- Lee C., Wooldridge, T. R. & Laimins, L. A. Analysis of the roles of E6 binding to E6TP1 and nuclear localization in the human papillomavirus type 31 life cycle. *Virology* 2007 ;358, 201–210.

- Lena AM, Shalom-Feuerstein R, Rivetti di Val Cervo P, Aberdam D, Knight RA, Melino G, Candi E. miR-203 represses 'stemness' by repressing DeltaNp63. *Cell Death Differ.* 2008 Jul;15(7):1187-95.
- Li Y, Vandenboom TG 2nd, Wang Z, Kong D, Ali S, Philip PA, Sarkar FH. miR-146a suppresses invasion of pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 2010 Feb 15;70(4):1486-95.
- Li Y, Wang F, Xu J, Ye F, Shen Y, Zhou J, Lu W, Wan X, Ma D, Xie X, Progressive miRNA expression profiles in cervical carcinogenesis and identification of HPV related target genes for miR-29, *J. Pathol.* 224 (2011) 484–495.
- Li, X. & Coffino, P. High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *J. Virol.* 70, 4509–4516 (1996).
- Lin SL, Chiang A, Chang D, Ying SY. Loss of mir-146a function in hormone-refractory prostate cancer. *RNA.* 2008 Mar;14(3):417-24.
- Liu X, Dakic A, Chen R, Disbrow GL, Zhang Y, Dai Y, Schlegel R. Cell-restricted immortalization by human papillomavirus correlates with telomerase activation and engagement of the hTERT promoter by Myc. *J Virol.* 2008 Dec;82(23):11568-76.
- Liu Y, Chen JJ, Gao Q, Dalal S, Hong Y, Mansur CP, Band V, Androphy EJ. Multiple functions of human papillomavirus type 16 E6 contribute to the immortalization of mammary epithelial cells. *J. Virol.* 73, 7297–7307 (1999).
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 2001; 25:402-408.
- Lodygin D, Tarasov V, Epanchintsev A, Berking C, Knyazeva T, Körner H, Knyazev P, Diebold J, Hermeking H. Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle.* 2008 Aug 15;7(16):2591-600.
- Mannweiler S, Sygulla S, Beham-Schmid C, Razmara Y, Pummer K, Regauer S. Penile carcinogenesis in a low-incidence area: a clinicopathologic and molecular analysis of 115 invasive carcinomas with special emphasis on chronic inflammatory skin diseases. *Am J Surg Pathol.* 2011 Jul;35(7):998-1006.

- Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. The use of polymerase chain reaction amplification for detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 1989; 7:209–14.
- Martinez I, Gardiner AS, Board KF, Monzon FA, Edwards RP, Khan SA Human papillomavirus type 16 reduces the expression of microRNA-218 in cervical carcinoma cells. *Oncogene*. 2008 Apr 17;27(18):2575-82.
- Mavrakis KJ, Wolfe AL, Oricchio E, et al. Genome-wide RNA-mediated interference screen identifies miR-19 targets in Notch-induced T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Cell Biol* 2010; 12: 372–379.
- McCance, D. J., Kopan, R., Fuchs, E. & Laimins, L. A. Human papillomavirus type 16 alters human epithelial cell differentiation *in vitro*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 7169–7173 (1988).
- McMurray HR, McCance DJ Human papillomavirus type 16 E6 activates TERT gene transcription through induction of c-Myc and release of USF-mediated repression. *J Virol*. 2003 Sep;77(18):9852-61.
- Melar-New M, Laimins LA. Human papillomaviruses modulate expression of microRNA 203 upon epithelial differentiation to control levels of p63 proteins. *J Virol*. 2010 May;84(10):5212-21.
- Miralles-Guri C, Bruni L, Cubilla AL, Castellsagué X, Bosch FX, de Sanjosé S Human papillomavirus prevalence and type distribution in penile carcinoma. *J Clin Pathol*. 2009 Oct;62(10):870-8. Epub 2009 Aug 25.
- Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*. 2010 Aug;10(8):550-60.
- Motsch N, Pfuhl T, Mrazek J, Barth S, Grässer FA. Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) induces the expression of the cellular microRNA miR-146a. *RNA Biol*. 2007 Nov;4(3):131-7.
- Müller DW, Bosserhoff AK. Integrin beta 3 expression is regulated by let-7a miRNA in malignant melanoma. *Oncogene*. 2008 Nov 6;27(52):6698-706.
- Myklebust MP, Bruland O, Fluge Ø, Skarstein A, Balteskard L, Dahl O. MicroRNA-15b is induced with E2F-controlled genes in HPV-related cancer. *Br J Cancer*. 2011 Nov 22;105(11):1719-25.

Oldak M, Tolzmann L, Wnorowski A, Podgórska MJ, Silling S, Lin R, Hiscott J, Müller CS, Vogt T, Smola H, Smola S. Differential regulation of human papillomavirus type 8 by interferon regulatory factors 3 and 7. *J Virol*. 2011 Jan;85(1):178-88.

Palefsky JM. HPV infection in men. *Dis Markers*. 2007;23(4):261-72.

Pichler K, Schneider G, Grassmann R. MicroRNA miR-146a and further oncogenesis-related cellular microRNAs are dysregulated in HTLV-1-transformed T lymphocytes. *Retrovirology*. 2008 Nov 12;5:100.

Pizzocaro G, Algaba F, Horenblas S, Solsona E, Tana S, Van Der Poel H, Watkin NA; European Association of Urology (EAU) Guidelines Group on Penile Cancer. EAU penile cancer guidelines 2009. *Eur Urol*. 2010 Jun;57(6):1002-12.

Punj V, Matta H, Schamus S, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded viral FLICE inhibitory protein (vFLIP) K13 suppress CXCR4 expression by upregulating miR-146a. *Oncogene* 2010 Mar 25;29(12):1835-44.

Rao Q, Zhou H, Peng Y, Li J, Lin Z Aberrant microRNA expression in human cervical carcinomas. *Med Oncol*. 2011 Jan 25. Reduced miR-128 in breast tumor-initiating cells induces chemotherapeutic resistance via Bmi-1 and ABCC5. *Clin Cancer Res*. 2011 Nov 15;17(22):7105-15.

Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, Del Mistro A, Gillio-Tos A, Minucci D, Naldoni C, Rizzolo R, Schincaglia P, Volante R, Zappa M, Zorzi M, Cuzick J, Segnan N. Results at recruitment from a randomized controlled trial comparing human papillomavirus testing alone with conventional cytology as the primary cervical cancer screening test. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100:492-501.

Rubin MA, Kleter B, Zhou M, Ayala G, Cubilla AL, Quint WG, Pirog EC Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. *Am J Pathol*. 2001 Oct;159(4):1211-8.

Sala A, Nicolaides NC, Engelhard A, Bellon T, Lawe DC, Arnold A, Graña X, Giordano A, Calabretta B. Correlation between E2F-1 requirement in the S phase and E2F-1 transactivation of cell cycle-related genes in human cells. *Cancer Res*. 1994 Mar 15;54(6):1402-6.

Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Noda T, Nagano H, Doki Y, Mori M, Hayashi N. The let-7 family of microRNAs inhibits Bcl-xL expression

and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2010 May;52(5):698-704.

Shukla S, Shishodia G, Mahata S, Hedau S, Pandey A, Bhambhani S, Batra S, Basir SF, Das BC, Bharti AC. Aberrant expression and constitutive activation of STAT3 in cervical carcinogenesis: implications in high-risk human papillomavirus infection. *Mol Cancer.* 2010 Oct 27;9:282.

Snijders PJF, Van Den Brule AJC, Schrijnemakers HFJ, Snow G, Meijer CJLM, Walboomers JMM. "The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes." *J General Virol,* 1990; 71:173-181

Stacey SN, Jordan D, Williamson AJ, Brown M, Coote JH, Arrand JR. "Leaky scanning is the predominant mechanism for translation of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein from E6/E7 bicistronic mRNA". *J Virol.* 2000; 74:7284-97.

Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Aug 15;103(33):12481-6.

Tagawa H, Seto M. A microRNA cluster as a target of genomic amplification in malignant lymphoma. *Leukemia* 2005; 19: 2013–2016.

Tornesello ML, Duraturo ML, Losito S, Botti G, Pilotti S, Stefanon B, De Palo G, Gallo A, Buonaguro L, Buonaguro FM. Human papillomavirus genotypes and HPV16 variants in penile carcinoma. *Int J Cancer.* 2008 Jan 1;122(1):132-7.

van Monsjou HS, van Velthuysen ML, van den Brekel MW, Jordanova ES, Melief CJ, Balm AJ. Human papillomavirus status in young patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2011 May 23. doi: 10.1002/ijc.26195.

van Monsjou HS, van Velthuysen ML, van den Brekel MW, Jordanova ES, Melief CJ, Balm AJ. Human papillomavirus status in young patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2011 May 23. doi: 10.1002/ijc.26195.

Veldman T, Liu X, Yuan H, Schlegel R. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jul 8;100(14):8211-6.

- Wang X, Tang S, Le S.Y, Lu R, Rader J.S, Meyers C, Zheng Z.M. Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth. *PLoS One* 3 (2008)
- Wang X, Wang HK, McCoy JP, Banerjee NS, Rader JS, Broker TR, Meyers C, Chow LT, Zheng ZM. Oncogenic HPV infection interrupts the expression of tumor-suppressive miR-34a through viral oncoprotein E6. *RNA*. 2009 Apr;15(4):637-47.
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 1993; 75: 855–862.
- Wise-Draper, T. M. & Wells, S. I. Papillomavirus E6 and E7 proteins and their cellular targets. *Front. Biosci.* 2008; 13, 1003–1017.
- Witten D, Tibshirani R, Gu S.G, Fire A, Lui W.O. Ultra-high throughput sequencing-based small RNA discovery and discrete statistical biomarker analysis in a collection of cervical tumours and matched controls, *BMC Biol.*8 (2010) 58.
- Xu K, Liang X, Cui D, Wu Y, Shi W, Liu J. miR-1915 inhibits Bcl-2 to modulate multidrug resistance by increasing drug-sensitivity in human colorectal carcinoma cells. *Mol Carcinog.* 2011 Nov 28. doi: 10.1002/mc.21832
- Yang CH, Yue J, Fan M, Pfeffer LM. IFN induces miR-21 through a signal transducer and activator of transcription 3-dependent pathway as a suppressive negative feedback on IFN-induced apoptosis. *Cancer Res.* 2010 Oct 15;70(20):8108-16.
- Yi R, Poy MN, Stoffel M, Fuchs E. A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'. *Nature.* 2008 Mar 13;452(7184):225-9.
- Yin KJ, Deng Z, Hamblin M, Xiang Y, Huang H, Zhang J, Jiang X, Wang Y, Chen YE. Peroxisome proliferator-activated receptor delta regulation of miR-15a in ischemia-induced cerebral vascular endothelial injury. *J Neurosci.* 2010 May 5;30(18):6398-408.
- Zhang H, Luo XQ, Zhang P, Huang LB, Zheng YS, Wu J, Zhou H, Qu LH, Xu L, Chen YQ. MicroRNA patterns associated with clinical prognostic parameters and CNS relapse prediction in pediatric acute leukemia. *PLoS One.* 2009 Nov 13;4(11):e7826.

Zhao H, Kalota A, Jin S, Gewirtz AM. The c-myc proto-oncogene and microRNA-15a comprise an active autoregulatory feedback loop in human hematopoietic cells. *Blood*. 2009 Jan 15;113(3):505-16.

Zheng ZM, Wang X. Regulation of cellular miRNA expression by human papillomaviruses. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Nov-Dec;1809(11-12):668-77. Epub 2011 May 17.

zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, Bornkamm GW. "Attempts to detect virus-specific DNA sequences in human tumors: I. Nucleic acid hybridization with complementary RNA of human wart virus". *Int J Cancer* 1974; 13:650-656.

zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2:342-350.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Prof.sor Palù e la Prof.ssa Barzon del Dipartimento di Istologia Microbiologia e Biotecnologie Mediche dell'Università di Padova per avermi permesso di intraprendere questi tre anni di dottorato. Ringrazio in particolare la Prof.ssa Barzon per avermi sempre aiutata e guidata in tutti questi tre anni. Un grazie a tutti i ragazzi del laboratorio ed in particolare alla dott.ssa Trevisan, dott. Sinigaglia e la dott.ssa Militello. In particolare ringrazio la dott.ssa Militello per essermi stata vicina sin da quando ero in tesi e per avermi dato una mano con gli esperimenti durante questi tre anni di dottorato. Ringrazio inoltre le dott.sse Barbara Di Camillo e Angela Grassi del Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione dell'Università di Padova per l'analisi statistica dei dati dei microarray, il Prof. Ambrogio Fassina e il dottor Rocco Cappellesso del Dipartimento di Medicina Diagnostica e Terapie Speciali dell'Università di Padova per l'analisi dei campioni di carcinoma e adenoma del pene.

Un grazie al mio fidanzato per avermi sempre sostenuta e di essermi stato vicino in questi anni. Alla fine ringrazio i miei genitori e la mia sorellina per aver accettato di starmi lontani per altri tre anni e per avermi sempre aiutata a seguire i mie sogni.